

**Ortsgerichtete Rekombination  
in *Chlamydomonas reinhardtii*  
am Beispiel  
des Cre/lox-Systems**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)  
der Naturwissenschaftlichen Fakultät III  
- Biologie und Vorklinische Medizin –  
der  
Universität Regensburg

vorgelegt  
von  
**Marion Mägdefrau**  
aus Regensburg  
Juni 2007

Promotionsgesuch eingereicht am 5.6.2007

Die Arbeit wurde angeleitet von Prof. Dr. P. Hegemann.

### **Prüfungsausschuss**

Vorsitzender: Prof. Dr. S. Schneuwly

Erster Gutachter: Prof. Dr. P. Hegemann

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. G. Hauska

Dritter Prüfer: Prof. Dr. W. Oertel

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>2</b>
<b>2.1</b>	<b>Die Grünalge <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> - Ein Modellorganismus.....</b>	<b>2</b>
<b>2.2</b>	<b>Ungerichtete Transformation des Kerngenoms.....</b>	<b>3</b>
2.2.1	Transposon-vermittelte Insertionsmutagenese .....	4
2.2.2	Die heterologe Genexpression in <i>C. reinhardtii</i> .....	5
2.2.3	Genstilllegungsmechanismen in <i>C. reinhardtii</i> .....	6
2.2.4	RNA Interferenz - Eine Methode zur gezielten Genregulierung .....	7
<b>2.3</b>	<b>Die gezielte Manipulation des Kerngenoms („gene targeting“) .....</b>	<b>8</b>
2.3.1	Die homologe Rekombination .....	8
2.3.2	Die ortsgerichtete Rekombination.....	13
2.3.3	Das Cre/ <i>lox</i> -Rekombinationssystem .....	14
2.3.4	Anwendungsmöglichkeiten des Cre/ <i>lox</i> -Rekombinationssystems.....	18
<b>2.4</b>	<b>Zielsetzung.....</b>	<b>21</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>23</b>
<b>3.1</b>	<b>Integration von <i>lox</i>-Erkennungssequenzen in <i>C. reinhardtii</i> .....</b>	<b>23</b>
3.1.1	Überprüfung des Einflusses einer <i>lox</i> -Sequenz auf die Genexpression.....	23
3.1.2	Etablierung eines <i>lox</i> -Vektors für den Rekombinationsassay.....	26
3.1.3	Integration von <i>lox</i> -Vektoren in das <i>C. reinhardtii</i> -Genom.....	31
<b>3.2</b>	<b>Expression der Cre-Rekombinase in <i>E. coli</i>.....</b>	<b>37</b>
3.2.1	Heterologe Expression und Reinigung.....	37
3.2.2	Aktivitätstest der aufgereinigten Cre-Rekombinase .....	39
3.2.3	Verwendung der gereinigten Cre-Rekombinase aus <i>E. coli</i> .....	39
3.2.3.1	Herstellung eines polyklonalen anti-Cre-Antikörpers.....	39
3.2.3.2	Elektroporation von <i>C. reinhardtii</i> mit einer FITC-markierten Cre .....	40

<b>3.3</b>	<b>Expression von Cre-Fusionsproteinen in <i>E. coli</i> .....</b>	<b>42</b>
3.3.1	<i>In vivo</i> Rekombinationsassay für Cre-Fusionsproteine.....	43
3.3.2	Expression und Reinigung der Cre-Fusionsproteine.....	44
3.3.3	Aktivitätstest der aufgereinigten Cre-Fusionsproteine.....	46
<b>3.4</b>	<b>Expression der Cre (P1) in <i>C. reinhardtii</i> .....</b>	<b>47</b>
3.4.1	Integration des pCR-Cre-Expressionsvektors .....	47
3.4.2	Überprüfung der Rekombinaseaktivität in <i>cw15Arg<sup>+</sup>A-2loxGA-APH/Cre</i> .....	48
<b>3.5</b>	<b>Expression der codonoptimierten Cre in <i>C. reinhardtii</i> .....</b>	<b>49</b>
3.5.1	Optimierung des <i>cre</i> -Gens (P1) an die „Codon Usage“ von <i>C. reinhardtii</i> .....	50
3.5.2	Expressionsvektoren für die codonoptimierte cCre .....	52
<b>3.6</b>	<b>Expression von Ble-Cre in <i>C. reinhardtii</i> .....</b>	<b>53</b>
3.6.1	Expressionsvektoren mit <i>ble-cre</i> .....	53
3.6.2	Expressionsvektoren mit <i>ble-ccreIn</i> .....	57
<b>3.7</b>	<b>Expression einer inaktiven cCre* in <i>C. reinhardtii</i> .....</b>	<b>62</b>
3.7.1	Expressionsvektoren für cCre* mit ARG7.8 als Selektionsmarker.....	62
3.7.2	Expressionsvektoren für Ble-cCre* .....	63
<b>3.8</b>	<b>„Cre-Selbsteliminierungs“-Strategie im <i>cw15<sup>+</sup></i>-Stamm .....</b>	<b>66</b>
<b>3.9</b>	<b><i>In vivo</i> Rekombinationsassay in <i>C. reinhardtii</i> .....</b>	<b>72</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>77</b>
<b>4.1</b>	<b>Generierung von <i>lox</i>-Rezipienten in <i>C. reinhardtii</i> .....</b>	<b>77</b>
<b>4.2</b>	<b>Rekombinationsassay mit gereinigter Cre-Rekombinase .....</b>	<b>80</b>
<b>4.3</b>	<b>Expression der Cre-Rekombinase in <i>C. reinhardtii</i> .....</b>	<b>82</b>
<b>4.4</b>	<b>Cre-vermittelte Rekombination in <i>C. reinhardtii-lox</i>-Rezipienten.....</b>	<b>86</b>
<b>4.5</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>88</b>
<b>5</b>	<b>MATERIAL .....</b>	<b>90</b>
<b>5.1</b>	<b>Laborutensilien .....</b>	<b>90</b>

<b>5.2</b>	<b>Geräte.....</b>	<b>90</b>
<b>5.3</b>	<b>Software .....</b>	<b>91</b>
<b>5.4</b>	<b>Biochemikalien .....</b>	<b>92</b>
<b>5.5</b>	<b>Enzyme und Antikörper.....</b>	<b>93</b>
<b>5.6</b>	<b>Kits .....</b>	<b>94</b>
<b>5.7</b>	<b>Puffer, Lösungen und Nährmedien.....</b>	<b>94</b>
<b>5.8</b>	<b>Verwendete Stämme .....</b>	<b>95</b>
<b>5.9</b>	<b>Fremde Plasmide.....</b>	<b>96</b>
<b>5.10</b>	<b>Eigene Plasmide.....</b>	<b>97</b>
<b>6</b>	<b>METHODEN .....</b>	<b>100</b>
<b>6.1</b>	<b>Kulturzucht .....</b>	<b>100</b>
6.1.1	Anzucht und Lagerung von <i>E. coli</i> .....	100
6.1.2	Kryokonservierung von <i>E. coli</i> .....	100
6.1.3	Kultivierung und Lagerung von <i>C. reinhardtii</i> .....	100
6.1.4	Bestimmung der Zellzahl .....	101
6.1.5	Kryokonservierung von <i>C. reinhardtii</i> .....	102
6.1.6	Auftauen von kryokonservierten <i>C. reinhardtii</i> .....	102
<b>6.2</b>	<b>Transformationsmethoden.....</b>	<b>103</b>
6.2.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> .....	103
6.2.2	Transformation von kompetenten <i>E. coli</i> .....	103
6.2.3	Transformation von <i>C. reinhardtii</i> .....	103
<b>6.3</b>	<b>Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>104</b>
6.3.1	Gensynthese .....	104
6.3.2	Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren.....	106
6.3.2.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	106
6.3.2.2	Isolierung von genomischer DNA aus <i>C. reinhardtii</i> .....	106
6.3.2.3	Herstellung von <i>C. reinhardtii</i> -Lysat für die PCR-Reaktion .....	107
6.3.2.4	Auftrennung von DNA mittels Gelelektrophorese.....	107

# INHALTSVERZEICHNIS

---

6.3.2.5	Aufreinigung von DNA.....	107
6.3.2.6	Konzentrationsbestimmung von gelöster DNA .....	107
6.3.3	Enzymatische Reaktionen mit DNA .....	108
6.3.3.1	Restriktionsverdau.....	108
6.3.3.2	Dephosphorylierung .....	108
6.3.3.3	Ligation .....	109
6.3.3.4	Phosphorylierung von DNA.....	109
6.3.3.5	Phosphorylierung von Oligonukleotiden .....	109
6.3.3.6	Hybridisierung von Oligonukleotiden.....	109
6.3.3.7	Klenow-Reaktion .....	110
6.3.3.8	Ortsgerichtete Rekombination.....	110
6.3.3.8.1	<i>In vitro</i> Rekombinationsassay in <i>E. coli</i> .....	110
6.3.3.9	Polymerase-Kettenreaktion .....	111
6.3.3.9.1	„Nested“-PCR .....	113
6.3.3.9.2	Einführung von Restriktionsschnittstellen (Insertionsmutagenese).....	113
6.3.3.9.3	„Overlap“-PCR.....	113
6.3.3.9.4	Einführung einer Punktmutation (ortsgerichtete Mutagenese) .....	114
6.3.3.9.5	Kolonie-PCR für <i>E. coli</i> -Transformanten .....	114
6.3.3.9.6	Genomische PCR für <i>C. reinhardtii</i> -Transformanten.....	115
6.3.3.10	DNA-Sequenzierung .....	115
6.3.3.11	Analyse von DNA Sequenzen.....	115
6.3.3.12	Southern Blot-Analyse .....	115
6.3.3.12.1	Herstellung der DIG-markierten Sonde.....	116
6.3.4	Klonierungsschema der verwendeten Plasmide .....	116
6.3.4.1	Expressionsvektoren in <i>E. coli</i> .....	118
6.3.4.2	<i>lox</i> -Plasmide für Rekombinationsassay .....	119
6.3.4.3	Expressionsvektoren für <i>C. reinhardtii</i> mit <i>ARG7.8</i> als Selektionsmarker ...	120
6.3.4.4	Expressionsvektoren für <i>C. reinhardtii</i> mit <i>ble</i> als Selektionsmarker .....	121
6.3.4.5	„Cre-Selbsteliminierungs“-Vektoren für <i>C. reinhardtii</i> .....	123
<b>6.4</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden.....</b>	<b>124</b>
6.4.1	Heterologe Genexpression in <i>E. coli</i> .....	124
6.4.1.1	Kultivierung und Induktion.....	124
6.4.1.2	Ernte und Lyse der Zellen .....	125
6.4.1.3	Proteinaufreinigung.....	125

# INHALTSVERZEICHNIS

---

6.4.1.4	Dialyse.....	126
6.4.1.5	Aufkonzentrierung von Proteinlösung .....	126
6.4.1.6	Markierung mit FITC .....	126
6.4.1.7	Elektroporation.....	126
6.4.2	Biochemische Standardmethoden .....	127
6.4.2.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	127
6.4.2.2	Coomassiefärbung von SDS-Gelen.....	127
6.4.2.3	Proteinmengenbestimmung nach Bradford.....	128
6.4.3	Immunologische Methoden.....	128
6.4.3.1	Gewinnung von polyklonalen Antiseren.....	128
6.4.3.1.1	Herstellung des Antigens .....	128
6.4.3.1.2	Überprüfung der Präimmunseren und Antikörpergewinnung.....	128
6.4.3.1.3	Aufreinigung der Antiseren.....	129
6.4.3.2	Western Blotting .....	129
6.4.3.3	Färbung von Blot-Membranen mit Ponceau S .....	130
6.4.4	Analyse von Reportergenen .....	130
6.4.4.1	Lumineszenzmessung.....	130
<b>7</b>	<b>LITERATUR .....</b>	<b>131</b>
<b>8</b>	<b>ANLAGEN .....</b>	<b>138</b>
<b>8.1</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>138</b>
<b>8.2</b>	<b>Oligonukleotide .....</b>	<b>140</b>
<b>8.3</b>	<b>„graphical codon usage analyzer“-für <i>cre</i>- und <i>ccre</i>-Gen.....</b>	<b>144</b>
<b>8.4</b>	<b>Vergleich von DNA-Sequenzen mit dem Programm „DNAMAN“.....</b>	<b>148</b>

## 1 ZUSAMMENFASSUNG

Die Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* hat sich in den vergangenen Jahrzehnten als Modellorganismus für diverse zellbiologische Problemstellungen etabliert. Es wurde eine Vielzahl von Methoden entwickelt, welche die Transformation des Algengenoms erlauben. Wie auch in höheren Pflanzen findet die Integration rekombinanter DNA nichthomolog, d.h. ungerichtet im Genom statt. Dies bedeutet, dass Positionseffekte, Mehrfachinsertionen und daraus resultierende Genstilllegungsmechanismen sowie mögliche Deletionen am Integrationsort die Genexpression des zu untersuchenden Transgens stark beeinflussen können und somit den direkten Vergleich unabhängiger Transformanten schwierig machen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine Methode etabliert werden, welche die gezielte Veränderung des *C. reinhardtii*-Genoms mittels ortsgerichteter Rekombination zulässt. Das Cre/lox-Rekombinationssystem, welches aus der Cre-Rekombinase und der loxP-Erkennungssequenz besteht, wird bereits erfolgreich in *E. coli*, Hefe, Säugerzellen und einigen Pflanzen angewendet.

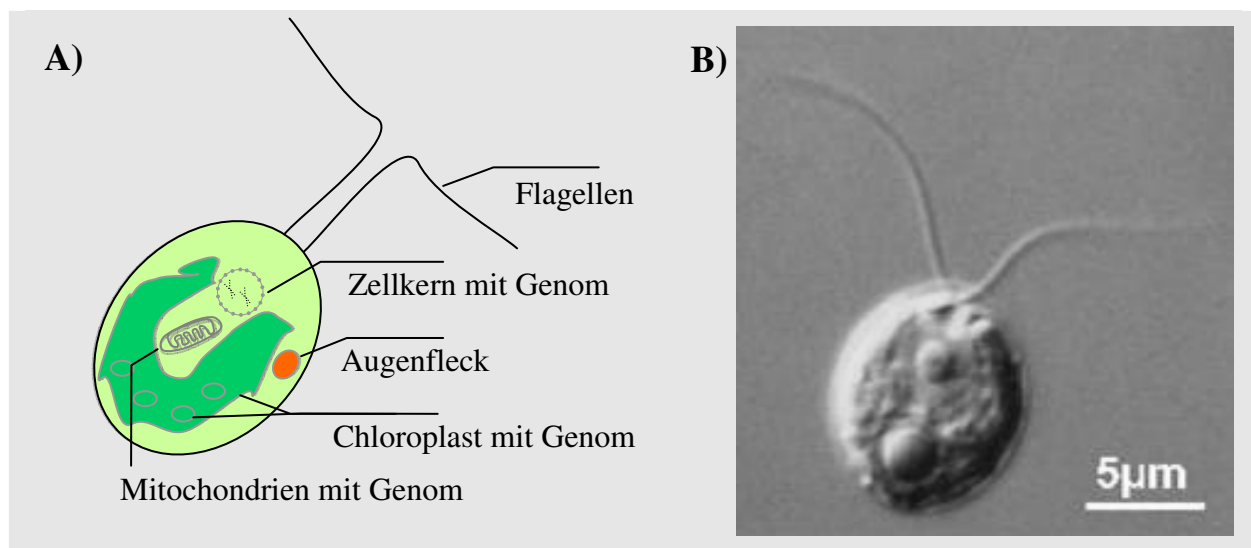
Für die ortsgerichtete Rekombination in *Chlamydomonas* wurde zuerst eine Expressionskassette mit einem Reportergen (*ble-crluc*) zwischen zwei identischen lox-Sequenzen unter der Kontrolle eines Tandem-Promotors und einem zweiten promotorlosen Selektionsmarkergen (*aphVIII*) in das Genom integriert. Mit Hilfe des entstandenen lox-Rezipienten-Stammes konnte durch die Cre-vermittelte Eliminierung des *ble-crluc*-Gens und der daraus resultierenden Aktivierung des *aphVIII*-Gens die Cre-Rekombinaseaktivität im Kerngenom von *C. reinhardtii* untersucht werden. Es wurden verschiedene Strategien zur Bereitstellung der Cre-Rekombinase im Zellkern von *C. reinhardtii* untersucht. Sowohl die Einführung eines gereinigten Cre-Enzyms mittels Elektroporation in die Zellen als auch die konstitutive Expression des *cre*-Gens in den Algen selbst führte nicht zum gewünschten Erfolg. Da ein toxischer Effekt des Enzyms nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde eine transiente Expression mit Hilfe der „Cre-Selbsteliminierungs“-Strategie realisiert. Dabei entfernt die Cre-Rekombinase ihre eigene kodierende Sequenz, welche sich ebenfalls zwischen zwei identischen lox-Erkennungssequenzen befindet, und limitiert somit selbst ihre Wirkungszeit auf das Algengenom. Diese Strategie ermöglichte erstmalig die ortsgerichtete Rekombination chromosomaler lox-Sequenzen in *C. reinhardtii*. Das Cre/lox-System bietet somit zukünftig einen effizienten Weg zur Entfernung von DNA-Sequenzen wie z.B. von Markergenen nach der erfolgreichen Transformation, aber auch eine Möglichkeit zur Integration rekombinanter DNA an spezifischen Stellen im Algengenom.



## 2 EINLEITUNG

### 2.1 Die Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* - Ein Modellorganismus

Bei der Gattung *Chlamydomonas* handelt es sich um Grünalgen, zu der über 600 verschiedene Spezies aus dem Meer, Süßwasser und Boden gehören. Der bekannteste und wohl auch am besten charakterisierte Vertreter ist *Chlamydomonas reinhardtii*. Diese einzellige Grünalge mit einer Länge von ca. 10µm besitzt am vorderen Pol ihres ellipsenförmigen Körpers zwei Flagellen, welche mit der Zellwand und den Basalkörperchen verankert sind. Die 10-20µm langen Peitschengeißeln dienen zur Fortbewegung. Der Augenfleck, welcher Bestandteil des Zellwahrnehmungsapparates ist, befindet sich in der Nähe des Zelläquators. Er ist für die lichtabhängigen Bewegungsreaktionen wie Phototaxis und Photophobie verantwortlich. Fast 40% des gesamten Zellvolumens nimmt ein becherförmiger Chloroplast ein, der die Grünalge zur Photosynthese befähigt (siehe schematische Abb. 2.1-a. Teil A).



**Abb. 2.1-a Die Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*.** A) Schematische Darstellung. B) Aufnahme mit dem Lichtmikroskop (H. Harz).

Bei *Chlamydomonas* handelt es sich um einen fakultativ heterotrophen Organismus. In Abwesenheit von Licht kann die Alge andere Kohlenstoffquellen wie Acetat zur Energiegewinnung nutzen. Das Genom im Zellkern ist auf 17 Chromosomen verteilt (55), es ist sehr GC-reich (ca. 62%) und besteht aus ca.  $10^8$  Basenpaaren. Während des vegetativen Lebenszyklus teilen sich haploide Zellen durch Mitose. Unter normalen Kulturbedingungen (Licht, Inkubationstemperatur von 20-25°C, Schütteln in Minimalmedium) besitzt *C. reinhardtii* eine Verdopplungszeit von 6-8h. Unter Stressbedingungen, beispielsweise bei Stickstoffmangel, kommt es zur Ausbildung von Gameten unterschiedlichen Paarungstyps

( $mt^+$ ,  $mt^-$ ). Die Verschmelzung der äußerlich gleichen Gameten führt zur Bildung einer diploiden Zygote, welche eine dickere Zellwand, aber keine Flagellen besitzt. Der diploide Zustand wird unter optimalen Lebensbedingungen durch Meiose wieder in den haploiden Zustand überführt. Der vegetative Zyklus beginnt von neuem. Aufgrund dieser vielfältigen Eigenschaften hat sich *C. reinhardtii* in den vergangenen Jahrzehnten zunehmend als Modellorganismus für ein breites Forschungsspektrum etabliert (wie Aufbau und Funktion von Flagellen, der Basalkörperchen und des Photosyntheseapparates, Charakterisierung lichtabhängiger Bewegungsreaktionen, Zell-Zell-Erkennung und Kontrolle des Zellzyklus (61)). Des Weiteren ist die Sequenzierung aller drei Genome (Kern, Chloroplast und Mitochondrien) abgeschlossen. *C. reinhardtii* war der erste Organismus, in dem durch den Beschuss mit DNA-präparierten Mikroprojekten („particle gun“) alle drei Genome stabil transformiert werden konnten (13, 78, 128).

## 2.2 Ungerichtete Transformation des Kerngenoms

Das Kerngenom kann neben dem „particle gun“-Verfahren und der Elektroporation (86) einfach durch starke Agitation der Algen in Anwesenheit von DNA, Glaskügelchen und Polyethylenglykol transformiert werden (78). Zellwandlose Mutanten werden ohne vorherige Behandlung der Algenkultur transformiert, beim Wildtyp wird zuerst mit einer Proteasebehandlung (Autolysin) die Zellwand für eine bessere Aufnahme der DNA teilweise degradiert. Die Integration der DNA findet dabei ungerichtet im Kerngenom statt (28, 79) und scheint nach einem ähnlichen Mechanismus wie die nichthomologe Rekombination (NHR) zu funktionieren. Wie auch in anderen eukaryontischen Organismen findet NHR u.a. zur DNA-Reparatur, insbesondere bei Doppelstrangbrüchen statt (18, 50, 71). Die ungerichtete Transformation bietet eine effiziente Methode zur Einführung von Mutationen in das *C. reinhardtii*-Genom und somit zur Funktionsanalyse von Genen (Insertionsmutagenese). Die ersten Transformationen wurden mit Auxotrophiemarkern, die zur Komplementierung von Mutationen im Stoffwechsel wie *ARG7.8* (Defekt für Argininosuccinatlyase (28)) oder *NIT1* (Defekt für Nitratreduktase (79)) dienten, durchgeführt. Die Verwendung von Auxotrophiemarkern ist bei der Transformation, z.B. zur Insertionsmutagenese, aber auf die jeweilige Stoffwechselmutante beschränkt. Eine weitere Gruppe endogener Selektionsmarker basiert auf modifizierten *C. reinhardtii*-Genen wie z.B. *CRY1-1*, welches für ein verändertes ribosomales Protein kodiert und Resistenz gegen Cryptopleurin und Emitin vermittelt (113). Durch Kotransformation können neben dem Selektionsmarker auch nichtselektierbare Gene in das Genom integriert werden (78). Dabei hat sich die Verwendung eines Vektors, der

sowohl den Selektionsmarker als auch das zweite gewünschte Gen enthält, im Vergleich zur Verwendung zweier separater Expressionsvektoren als effizienter erwiesen. Die Koexpressionsraten konnten so von 10-50% (78) auf bis zu 80% für das nichtselektierte Gen gesteigert werden (32).

Die ungerichtete Insertionsmutagenese ist für Gene geeignet, die für einen selektierbaren Phänotyp kodieren (z.B. Untersuchung von Flagellen). Für die Funktionsanalyse essentieller Gene ist die Insertionsmutagenese dagegen ungeeignet, da es sich bei *C. reinhardtii* um einen haploiden Organismus handelt und die entstandenen Mutationen lethal sein können. Ein weiterer Nachteil der ungerichteten DNA-Integration ist das Vorkommen von Deletionen genomischer DNA (10 bis 20kb) im Bereich der Insertion, was zum Verlust von kodierenden Genen führen kann (165).

### 2.2.1 Transposon-vermittelte Insertionsmutagenese

Im *C. reinhardtii*-Genom konnten aktive Transposons identifiziert werden. Transposons („springende Gene“) können einen erheblichen Teil des Genoms ausmachen. Die Einteilung der Transposons erfolgt nach der Zwischenstufe der Transposition in zwei Hauptgruppen. Die erste Gruppe bilden die DNA-Transposons, welche über eine DNA-Zwischenstufe integrieren wie das Transposon *Gulliver* aus *C. reinhardtii* (34). Die zweite Gruppe stellen die Retrotransposons dar, welche über ein RNA-Intermediat integrieren. Zu ihnen gehört *TOC1* (*TOC* = transposon of *Chlamydomonas*, (25)).

Ein weiteres Unterscheidungskriterium ist der Transpositionsmechanismus. Bei der nichtreplikativen Transposition („cut&paste“-Prinzip) wird die gesamte Einheit, flankiert von zwei „inverted repeats“, an den neuen Integrationsort mit Hilfe einer Transposase transferiert (80). Im Gegensatz dazu verläuft die replikative Transposition nach dem „copy&paste“-Mechanismus, wobei zuerst die gesamte Sequenz verdoppelt und dann in den Rezipientenort mit Hilfe einer Resolvase integriert wird (54). Aufgrund der DNA-strukturändernden Eigenschaften stellen Transposons Mutagene dar, welche mit der Zerstörung funktioneller Gene, Deletionen und Neuordnungen innerhalb des Genoms einhergehen können. Viele dieser Mutationen sind durch die erneute Transposition an einen anderen Genlocus reversibel.

Mit Hilfe der Transposon-vermittelten Insertionsmutagenese („transposon tagging“) können Gene isoliert werden, die durch Insertion eines gut untersuchten Transposons hervorgegangen sind. Diese Art der Insertionsmutagenese ist in Bakterien, Hefe, Pflanzen und Säugerzellen eine verbreitete Technik, siehe Abb. 2.2-a. In *C. reinhardtii* konnten auf diese Weise 14 *nit2*<sup>-</sup>-Mutanten, welche durch spontane Insertion von Transposons in die kodierende Region des

*NIT2*-Gen entstanden sind, identifiziert werden. Zwei dieser *nit2*<sup>-</sup>-Mutanten resultieren aus der Integration des Transposons *Gulliver* (143). Mit Hilfe der bekannten Transposonsequenzen konnten die betroffenen Gene isoliert und weiter charakterisiert werden. Im Gegensatz zur ungerichteten Insertionsmutagenese mit Plasmiden stellt diese Methode eine Möglichkeit bereit, „natürlich“ vorkommende Mutationen zu untersuchen, ohne eine Veränderung flankierender Chromosomenabschnitte zu verursachen.

Organismus	„transposon tagging“ als Insertionsmutagenese
Bakterien	Transposon basierendes Fluoreszenzmarkersystem (81, 88)
<i>S. cerevisiae</i>	Ty-Element als Transformationsvektor (47, 136)
<i>Zea mays</i>	Ac/Dc-Transposonsystem in Pflanzen (35, 52, 109, 174)
<i>D. melanogaster</i>	artifizielle P-Elemente als Transformationsvektoren (133)
Säugerzellen	Verwendung von künstlichem Transposon <i>Sleeping Beauty</i> (SB) und modifizierten P-Elementen (70, 131)

**Abb. 2.2-a Verwendung von „transposon tagging“ in verschiedenen Organismen.**

Eine gezielte Integration von DNA mit Hilfe von Transposons ist in Eukaryonten jedoch nicht möglich, da die Insertion im Gegensatz zu bakteriellen Transposons nicht sequenzspezifisch erfolgt.

## 2.2.2 Die heterologe Genexpression in *C. reinhardtii*

Die stabile Expression heterologer Gene in *C. reinhardtii* ist ähnlich wie in Pflanzen noch immer problematisch. Eine Vielzahl von Faktoren, welche die Transkription und die Translation von Transgenen beeinflussen, wurde in den letzten Jahrzehnten intensiv untersucht. So kann sich die Verwendung rekombinanter Gene mit einer abweichenden Codonverwendung negativ auswirken. Beispielsweise werden Codons mit einem A oder T in der dritten Position in *C. reinhardtii* selten verwendet (62, 103). Die Selektion von optimalen Codons für die Translation scheint Voraussetzung für eine stabile und hohe Genexpression zu sein (111). Mit Hilfe der ungerichteten Transformation konnten Resistenzgene aus Bakterien, die einen hohen GC-Gehalt aufweisen wie z.B. *ble* (kodiert für das Phleomycinbindeprotein, Resistenz gegen Zeozin (160)), *aph7*<sup>''</sup> (Phosphotransferase, Resistenz gegen Hygromycin B (7)) und *aphVIII* (Phosphotransferase, Resistenz gegen Paromomycin (153)) als Selektionsmarker stabil in das *C. reinhardtii*-Genom insertiert werden. Die hohe Codonselektivität und der erhöhte GC-Gehalt machen die Anpassung rekombinanter Gene an

die Codon Usage von *C. reinhardtii* für eine stabile Expression notwendig (103). So konnte für die synthetisch hergestellten Reportergene *cgfp* (*gfp*-Gen, ursprünglich aus *Aequorea victoria*, kodiert für das Grün fluoreszierende Protein) und *crluc* (*rluc*-Gen aus *Renilla reniformis*, kodiert für eine Luciferase) infolge der verwendeten Codon Usage aus *C. reinhardtii* eine Verbesserung der heterologen Genexpression nachgewiesen werden (41, 42). Die Kontrolle durch endogene regulatorische Elemente wie z.B. dem Promotor und der 3'-UTR (nichttranslatierte Region) des stark exprimierten *RBCS2*-Gens (kodiert für die kleine Untereinheit der Ribulose-1,5-biphosphat-Carboxylase-Oxygenase) führen im Zusammenhang mit der angepassten Codon Usage ebenfalls zu einer Optimierung der Expression. Die Integration des Intron1 aus dem *RBCS2*-Gen wirkt sich dabei noch zusätzlich, unabhängig von seiner Orientierung, als Verstärker („enhancer“) auf das Expressionslevel aus (94). Ein Fragment des *HSP70A*-Promotors konnte als Transkriptionsaktivator für benachbarte Promotoren wie den *RBCS2*-, den  $\beta_2$ -*TUB*- und den *HSP70B*-Promotor identifiziert werden (145). Infolgedessen hat sich die Kombination aus dem synthetischen *HSP70A/RBCS2*-Tandempromotor mit dem Intron1 (*HSP-R-In*) und der 3'-UTR aus dem *RBCS2*-Gen für die heterologe Genexpression in *C. reinhardtii* etabliert (siehe Abb. 2.2-b).



**Abb. 2.2-b Vektor für die heterologe Genexpression in *C. reinhardtii*.** HSP-R-In = *Hsp70A/RBCS2*-Tandempromotor mit Intron1, UTR = 3'-UTR aus dem *RBCS2*-Gen, *bla* = Ampicillinresistenzgen für die Selektion in *E. coli*.

## 2.2.3 Genstilllegungsmechanismen in *C. reinhardtii*

Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Selektionsmarkern konnte das eubakterielle *aadA*-Gen (kodiert für die Aminoglykosid-Adenyltransferase (51)), welches bereits erfolgreich als Selektionsmarker bei der Chloroplastentransformation in *C. reinhardtii* verwendet wurde, unter Kontrolle der 5'- und 3'-UTR des *RBCS2*-Gens im Kerngenom in Abwesenheit des Aminoglykosid-Antibiotikums Spektinomycin nicht stabil exprimiert werden (18). Bei mehr als 50% der Transformanten war die Genexpression des chimären *RBCS2-aadA-RBCS2*-Gens infolge von Genstilllegungsmechanismen auf transkriptioneller Ebene („transcriptional gene silencing“ = TGS) und auf posttranskriptioneller Ebene (PTGS) unterdrückt. TGS und PTGS stellen für den Organismus u.a. Mechanismen zum Schutz vor fremder DNA (Viren, Transposons) dar, aber auch die Aktivität endogener Gene wird mit Hilfe dieser Genstilllegungsmechanismen reguliert (72, 100, 101, 157, 176).

Positionseffekte, bedingt durch die ungerichtete Integration des Transgens in das Genom, können sich ebenfalls auf die Stabilität der heterologen Genexpression auswirken (69, 99). Mehrfachinsertionen, die als komplexe Strukturen (Concatemere) organisiert sein können (28, 29), wurden neben *C. reinhardtii* bereits für Hefe, Säugerzellen und Pflanzen beschrieben (9, 18, 38, 120, 130). Solche repetitiven Sequenzen tendieren dazu, bedingt durch interchromosomale und intramolekulare Rekombination, strukturell instabil zu sein (9), ebenso kann ihre Expression durch Genstilllegungsmechanismen unterdrückt werden (100, 118, 171). Aber auch Einfachinsertionen können in *C. reinhardtii* infolge eines von der DNA-Methylierung unabhängigen Mechanismus stillgelegt werden, wobei wahrscheinlich Änderungen in der Chromatinstruktur zur Unterdrückung der Genexpression führen (17, 72).

### **2.2.4 RNA Interferenz - Eine Methode zur gezielten Genregulierung**

In *Caenorhabditis elegans* wurde zuerst der Mechanismus der posttranskriptionellen Genstilllegung zum gezielten „knockdown“ eines Gens beschrieben (36). Die Einführung von synthetischer doppelsträngiger RNA *in vitro* führte zum Abbau der entsprechenden mRNA und unterdrückte damit die Genexpression. Der als RNA-Interferenz (RNAi) bekannte Prozess wird mittlerweile in vielen eukaryontischen Organismen zur Regulierung spezifischer Gene verwendet (31, 48, 95, 178). In *C. reinhardtii* stellt RNAi ebenfalls eine effektive Methode zur Inaktivierung der Genexpression dar. So konnte die Expression des Chlamyopsinsgens (kodiert für ein Retinal-bindenes Protein) auf unter 10% des Expressionlevels im Vergleich zum Wildtyp reduziert werden (43). Ein Tandemkonstrukt aus der kodierenden Sequenz (Sense) und der umgekehrt komplementären cDNA-Sequenz (Antisense) dieses Gens, unter der Kontrolle des starken HSP-R-In-Promotors, fungierte unter Ausbildung eines RNA-Duplex als Auslöser für die RNAi. Die RNA-Interferenz ist bisher die effizienteste Methode zur gezielten negativen Regulation der Transkription eines Gens im *C. reinhardtii*-Kerngenom (144).

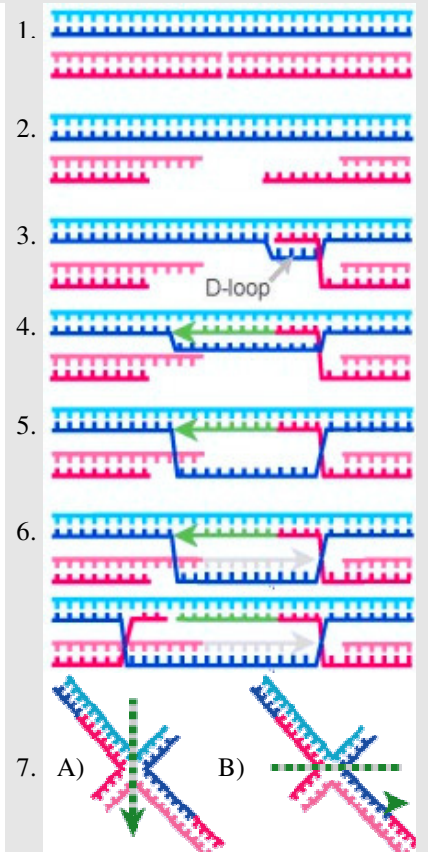
## 2.3 Die gezielte Manipulation des Kerngenoms („gene targeting“)

### 2.3.1 Die homologe Rekombination

Ganz anders verhält sich die Situation im Chloroplastengenom von *C. reinhardtii*. Nach der Endosymbiontentheorie haben die Chloroplasten photosynthesebetreibender Organismen ihren Ursprung in frühen Cyanobakterien (15). Die Chloroplasten besitzen ihr eigenes Regulationssystem für die Replikation, Transkription und Translation, welches im Aufbau dem der Bakterien gleicht (13, 116, 173). Tatsächlich konnten in den Organellen auch analoge Mechanismen für die homologe Rekombination identifiziert werden. Die homologe Rekombination (HR) übernimmt im Allgemeinen eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität. In vegetativen Zellen besteht die primäre Funktion der HR in der Reparatur von DNA-Schäden wie Doppelstrangbrüchen und Einzelstranglücken. Des Weiteren ist sie für die genetische Variabilität in pro- und eukaryontischen Organismen verantwortlich. Der Verlauf der homologen Rekombination ist auf molekularbiologischer Ebene für *E. coli* und Hefe am besten charakterisiert. Das eigentliche Rekombinationsereignis („crossing over“) wird dabei durch Doppelstrangbrüche ausgelöst (151, 163). In Abhängigkeit von der Anzahl der Rekombinationsereignisse können neben einfachen auch doppelte „crossing over“ stattfinden. Das dazugehörige Doppelstrangmodell ist für *E. coli* schematisch in Abb. 2.3-a dargestellt. Wie unter Punkt 7 zu sehen ist, kann die Auflösung der „Holliday-Struktur“ in zwei Orientierungen erfolgen, die Spaltung der DNA-Stränge führt entweder zu einem rekombinanten Duplex („crossing over“, siehe Teil A) oder wieder zu den Ausgangssträngen (kein „crossing over“, siehe Teil B).

Für das Chloroplastengenom in *C. reinhardtii* konnte ebenfalls gezeigt werden, dass durch Doppelstrangbrüche die homologe Rekombination induziert werden kann (30). Nakazato et al. konnten ein dem RecA-Protein analoges Protein (REC1) in den Chloroplasten nachweisen, dessen Transkription durch Mutagene wie Methylmethansulfonat aktiviert werden kann (110). Sie scheinen, wie auch Chloroplastengenome höherer Pflanzen, ebenfalls einen RecA-abhängigen Rekombinationsmechanismus zu besitzen (16, 19). Mit Hilfe der homologen Rekombination ist unter Verwendung genspezifischer Sequenzen die gezielte Manipulation des Chloroplastengenoms in *Chlamydomonas* möglich (10, 37, 164). Die Expression rekombinanter Gene bedingt, wie bereits für die Transformation des Kerngenoms beschrieben, die vorherige Anpassung der Gensequenz an die bevorzugte Codon Usage des *C. reinhardtii*-Chloroplastengenoms (40, 102, 104).

1. Doppelstrangbruch im Rezipient initiiert die Rekombination.
  2. Die Lücke wird vergrößert, eine 3'-einzelseitige DNA entsteht mit Hilfe der Nuklease RecBCD.
  3. Die einzelseitige DNA wird RecA-vermittelt in den homologen Bereich der Doppelhelix transferiert und bildet einen Heteroduplex (D-loop).
  4. Das 3'-Ende des Einzelstranges dient als Primer für die DNA-Synthese (grüner Pfeil). Der D-Loop vergrößert sich über die gesamte Lücke.
  5. Das 3'-Ende des zweiten Einzelstranges (pink) dient im homologen Bereich ebenfalls als Primer für die DNA-Synthese.
  6. Auf jeder Seite ist ein Heteroduplex entstanden. Die Stabilisierung der überkreuzten Struktur (Holliday-Struktur) erfolgt durch kovalente Bindungen.
- Durch „branch migration“ kann der Bereich mit Hilfe von RuvAB wandern (nicht dargestellt).
7. RuvC spaltet die Holliday-Struktur (beide Orientierungen möglich), DNA-Ligasen verknüpfen die entstandenen freien Enden.



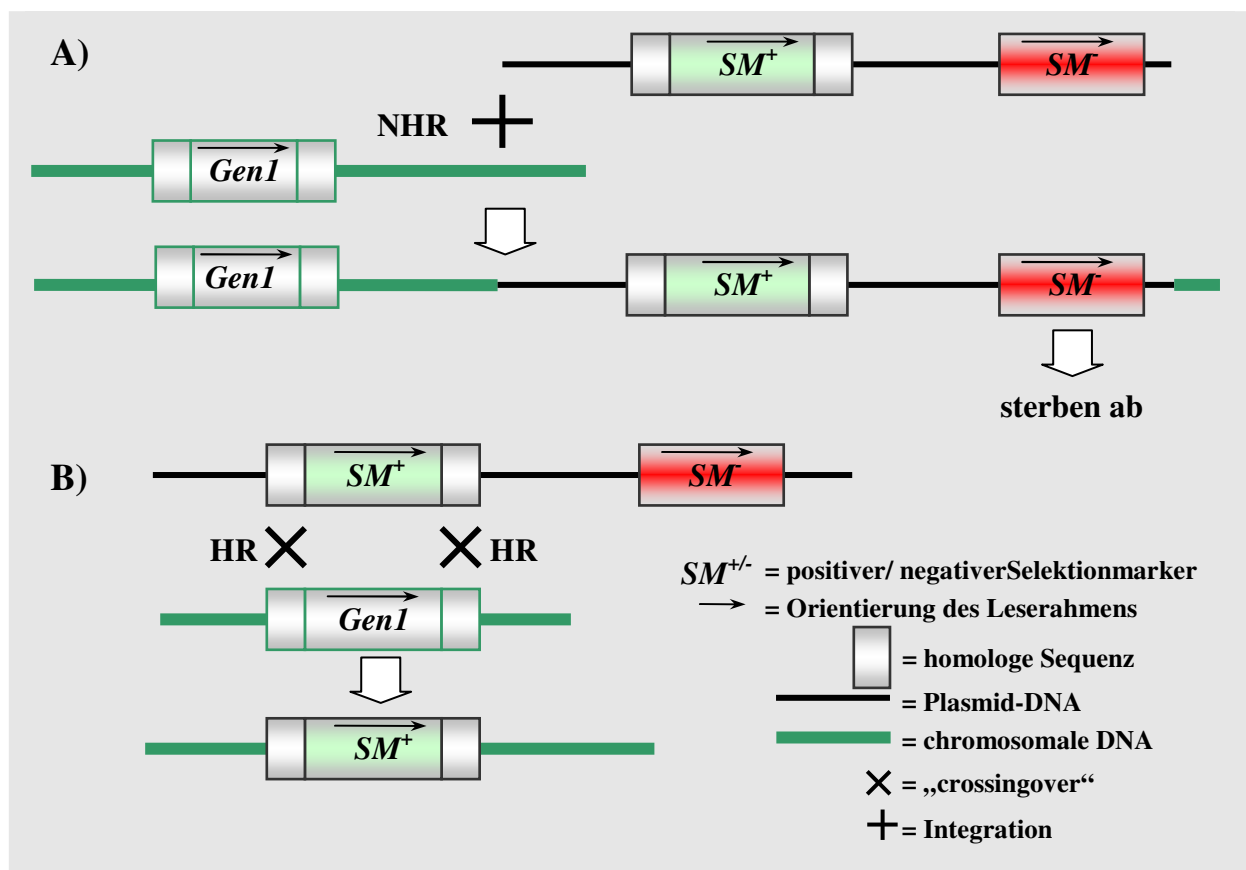
**Abb. 2.3-a Doppelstrangbruchreparatur-Modell** für ein mögliches doppeltes „crossing over“ in *E. coli*, verändert nach Figure 15.7 und 15.8 (90).

Im Kerngenom von *C. reinhardtii* wurde ebenfalls die Maschinerie für die homologe Rekombination nachgewiesen. Sowohl für den Auxotrophiemarker *NIT1* als auch für *ARG7.8* konnte durch Kotransformation zweier nichtfunktioneller Genkopien in die jeweilige Mutante der prototrophe Phänotyp wiederhergestellt werden (56, 154). Nur nach einer erfolgreichen extrachromosomalen homologen Rekombination der zwei nichtfunktionellen Fragmente konnte für 10% der Transformanten ein funktionsfähiges Gen entstehen und die Mutation komplementieren. Homologe Rekombination im eigentlichen Sinne (Austausch des fehlerhaften Genlocus durch eine funktionelle Kopie) fand dagegen nur für einen von 1000 Transformanten statt. Für die gezielte Unterbrechung des *NIT8*-Gens mit Hilfe des *CRY1-1* Selektionsmarkers konnte für einen von 2000 Transformanten die Integration durch HR nachgewiesen werden (112). Wie auch bei höheren Eukaryonten, ist die Integration durch nichthomologe Endverknüpfung wesentlich häufiger zu finden als die homologe Rekombination. Findet bei Hefe oder bei dem Moos *Physcomitrella patens* die Integration durch HR etwa bei 10% der Transformanten statt (53, 141), so liegt das Verhältnis bei Säugerzellen in einem Bereich von  $10^{-2}$  bis  $10^{-3}$ , bei *C. reinhardtii* bei  $10^{-3}$  und bei Pflanzenzellen sogar nur noch bei  $10^{-3}$  bis  $10^{-6}$  (12, 106). Die ungerichtete Integration (siehe



auch Insertionsmutagenese) in das Kerngenom ist dabei häufig mit Deletionen und Umstrukturierungen genomischer DNA verbunden (154). Durch die gezielte Manipulation („gene targeting“ durch HR) können dagegen spezifische Mutationen durch Substitution, Deletion oder Integration von Basenpaaren an einem definierten Genlocus durchgeführt werden und so auch Gene mit unbekannten Funktionen untersucht werden.

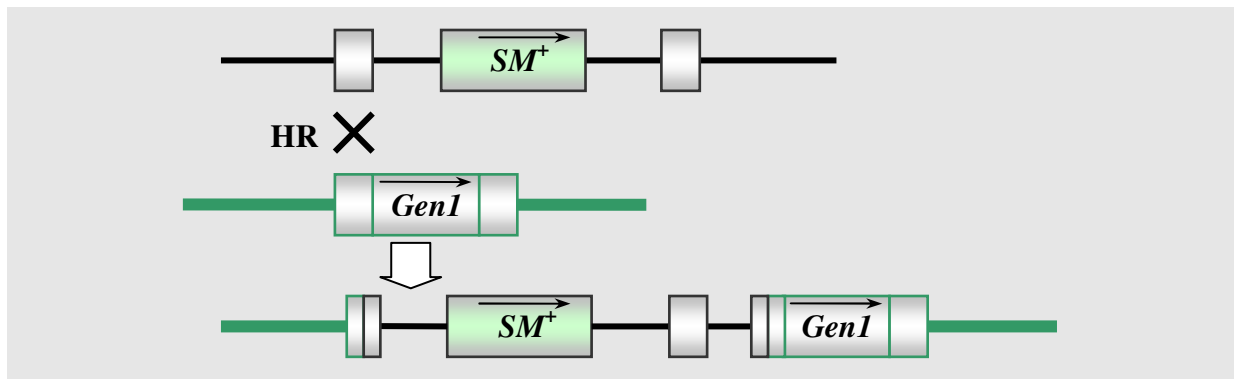
Verschiedene Strategien wurden mittlerweile unternommen, um das ungünstige Verhältnis zwischen HR und NHR zu optimieren. Eine Methode zur Anreicherung von Rekombinationsereignissen durch HR in Pflanzen ist die Positiv-Negativselektion (106, 169). Die Kombination von zwei Selektionsmarkern, einem positiven Selektionsmarker (lokalisiert zwischen den homologen Sequenzen) und einem negativen Selektionsmarker (außerhalb des homologen Bereiches), führt zum Absterben von Transformanten, welche beide Selektionsmarker durch NHR im Genom tragen (siehe Abb. 2.3-b Teil A). Dagegen können Transformanten, die durch einen HR-vermittelten Genaustausch (doppeltes „crossing over“, Teil B) nur den positiven Selektionsmarker integriert haben, selektiert werden.



**Abb. 2.3-b Positiv-Negativselektion.** A) Ungerichtete Integration: Positiv-Negativselektion eliminiert durch NHR resultierende Transformanten. B) Genaustausch durch doppeltes „crossing over“ führt zur alleinigen Integration des positiven Selektionsmarkers.

In Reis wurde das *dtA*-Gen (kodiert für das Diphteria Toxin A-Fragment) als negativer Selektionsmarker verwendet (166). Die Gesamtanzahl der Transformanten konnte aber nur

um den Faktor 10 zugunsten der homologen Rekombination reduziert werden. Auch in *C. reinhardtii* konnte bisher noch kein effizienter negativer Selektionsmarker etabliert werden. Die Verwendung des codonoptimierten *dtA*-Gens führte ebenfalls nur zu einer Reduktion der Transformationsrate um den Faktor fünf bis zehn (persönliche Mitteilung Boris Zorin). Ein weiterer Nachteil des Systems ist die Selektion für doppelte „crossing over“. In *C. reinhardtii* ist der HR-vermittelte Genaustausch sehr selten (112). Homologe Rekombinationsereignisse, die infolge eines einfachen „crossing overs“ zur Integration des gesamten Vektors in das Algen-genom führen (siehe Abb. 2.1-a), würden unter Verwendung eines negativen Selektionsmarkers eliminiert werden (nicht dargestellt).



**Abb. 2.3-c Integration durch einfaches „crossing over“** dargestellt für die homologe Sequenz „upstream“ vom positiven Selektionsmarker, alternativ kann die Insertion über die homologe Sequenz „downstream“ vom  $SM^+$  stattfinden (Zeichenerklärung, siehe Abb. 2.3-b).

Ein weiterer Ansatz in Pflanzen, das Verhältnis zwischen NHR und HR zu verbessern, ist die Stimulation der homologen Rekombination durch die Überexpression der *E. coli*-Gene *recA* und *ruvC* (129, 148). In *C. reinhardtii* konnten bisher das *RAD51*-homologe *ChlamyRAD51* und verwandte Gene wie *ChlamyRAD51B* sowie *ChlamyRAD51C* charakterisiert werden, *in vitro* wurde die Teilnahme des *C. reinhardtii*-Proteins RAD51 beim Strangtausch nachgewiesen (149). Die Überexpression eines codonoptimierten *RAD54*-Gens aus Hefe sowie des *REC1*-Gens aus den *C. reinhardtii*-Chloroplasten führten zu keiner Verbesserung der homologen Rekombination, dafür konnte für *REC1* eine erhöhte Toleranz gegenüber UV-Licht detektiert werden (persönliche Mitteilung Irina Sizova).

Auch die Einführung von Doppelstrangbrüchen im homologen Sequenzbereich des Integrationsvektors führte nur zu einer leichten Erhöhung der Transformationsrate (Faktor 2,5) zugunsten der HR (179). In Hefe konnte dagegen durch die Linearisierung des Vektors im Vergleich zur zirkulären DNA eine deutlich effizientere Integration mittels HR detektiert werden (117). Die Generierung von spezifischen Doppelstrangbrüchen im *Chlamydomonas*-Genom setzt den Einsatz spezieller Restriktionsendonukleasen voraus. Enzyme zu finden, welche ausschließlich im zu untersuchenden Genlocus schneiden, ist schwierig. Einen

möglichen Lösungsansatz könnten künstliche Zinkfinger-Nukleasen bieten. Deren DNA-Erkennungssequenz kann moduliert und damit gezielt an die Zielregion angepasst werden (8). Die Expression einer codonoptimierten Zinkfinger-Nuklease im *Chlamydomonas*-Kerngenom ist in Vorbereitung (persönliche Mitteilung Irina Sizowa).

Neben den Strategien zur Stimulierung der HR ist die Minimierung der NHR eine weitere Möglichkeit, das ungünstige HR/NHR-Verhältnis zu optimieren. Kürzlich gelang es in *C. reinhardtii* durch die Verwendung einzelsträngiger DNA, die Transformationrate für die NHR um den Faktor 100 zu reduzieren. Dabei scheinen sowohl doppelsträngige DNA als auch einzelsträngige DNA ähnlich effizient als Substrat für die homologe Rekombination zu fungieren. Da die Integration einzelsträngiger DNA durch NHR deutlich reduziert ist, wird so eine einfache Selektion homologer Rekombinanten möglich (179). Trotz des verbesserten Verhältnisses HR/NHR steckt die homologe Rekombination im Kerngenom von *C. reinhardtii* noch immer in den Anfängen. So kann es beim Austausch durch längere heterologe Fragmente, wie es bei der Transformation von Selektionsmarkern der Fall ist, zum Wechsel von der HR zur NHR kommen (112). Ein ähnliches Phänomen konnte in Säugerzellen aufgezeigt werden (135). Die Komposition des Vektors für die Integration oder den Austausch einer spezifischen DNA-Sequenz ist für den Erfolg der homologen Rekombination und somit für die gezielte Veränderung eines Gens entscheidend.

In Tab. 2.3-a sind die Vor- und Nachteile der ungerichteten Transformation im Vergleich zur „gene targeting“-Methode mittels homologer Rekombination zusammengefasst.

Ungerichtete Transformation	Homologe Rekombination
<b>Vorteile</b>	
✓ unabhängige Transformanten	✓ präzise Veränderung am gewünschten
✓ gute Transformationsraten	Genlocus möglich
✓ universeller Expressionsvektor	✓ Reproduzierbarkeit
<b>Nachteile</b>	
✓ ungerichtete Integration	✓ homologe Sequenz muss bekannt sein
✓ Positionseffekte	✓ im Kerngenom geringe Effizienz
✓ Genstilllegungsmechanismen (TGS und PTGS) durch Mehrfachinsertionen	✓ Austausch großer heterologer Sequenzen problematisch, bei Wechsel von HR zur
✓ Deletionen genomischer DNA	NHR Deletionen möglich

**Tab. 2.3-a Vergleich der ungerichteten Transformation** mit dem durch HR-vermittelten „gene targeting“ in *C. reinhardtii*.

## 2.3.2 Die ortsgerichtete Rekombination

Ein weniger präziser Vorgang im Vergleich zur homologen Rekombination ist die ortsgerichtete Rekombination, welche spezifische, teilweise homologe Sequenzen (14-50bp) voraussetzt. Die ortsgerichtete Rekombination ist charakteristisch für die Integration von Phagen-DNA in den Bakterienwirt, die Exzision der Phagen-DNA aus dem Bakterienchromosom sowie für die Auflösung multimerer zirkulärer Replikons z.B. von Plasmiden (5).

Es gibt eine Vielzahl von Rekombinationssystemen in Pro- und Eukaryonten. Die Hauptunterteilung erfolgt dabei nach dem Rekombinationsmechanismus in zwei Gruppen. Die erste Gruppe der Lambda ( $\lambda$ ) Integrasen, zu der mehr als 100 Mitglieder gehören, weisen wenige Sequenzhomologien auf. Der Mechanismus erfolgt aber für alle diese Integrasen über die Ausbildung einer Holliday-Struktur (22). Die zweite Gruppe der Invertasen-Resolvasen rekombiniert nach dem replikativen oder dem nichtreplikativen Transpositionsmechanismus. In der folgenden Tabelle sind bekannte Vertreter beider Gruppen dargestellt.

Gruppe	Organismus: Rekombinase/Erkennungssequenz
<b>Lambda (<math>\lambda</math>) Integrasen:</b>	Phage $\lambda$ : <i>Int/aat</i> , Bakteriophage P1: <i>Cre/loxP</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 2 $\mu$ m Plasmid: <i>FLP/FRT</i> , <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> : <i>R/RS</i> (4, 45, 107, 115)
<b>Invertasen-Resolvasen:</b>	Transposon gamma-delta ( $\gamma\delta$ auf <i>E. coli</i> F-Plasmid kodiert): Transposase ( <i>tnpA</i> )/Resolvase ( <i>tnpR</i> )/ <i>res</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> : <i>Hin/hix</i> , Phage Mu: <i>Gin/gix</i> (54, 74, 85)

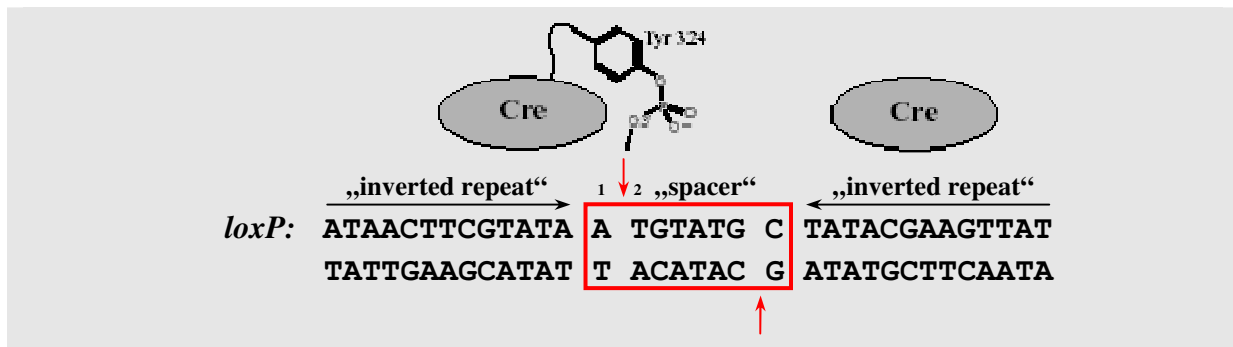
**Tab. 2.3-b Verschiedene Rekombinationssysteme.**

Die einfachsten Rekombinationssysteme bestehen dabei aus der Rekombinase, welche die Reaktion katalysiert, und zwei identischen oder fast identischen Erkennungssequenzen (134). Sie benötigen keine weiteren Kofaktoren oder zusätzliche Proteine. Das gentechnisch am häufigsten verwendete Rekombinationssystem, neben dem *FLP/FRT*-System, ist das *Cre/lox*-System aus dem Bakteriophagen P1 (158). Für den Phagen ist die *Cre*-Rekombinase zum einen für die Zirkularisierung der linearen P1-Phagen-DNA verantwortlich als auch für die Auflösung von Plasmid-Dimeren zu Monomeren, was essentiell für deren Erhalt und Weitergabe je einer Kopie an die Tochterzelle ist.

Im weiteren Verlauf der Arbeit beziehen sich alle Angaben bezüglich der ortsgerichteten Rekombination auf das Cre/lox-System, welches in den folgenden Kapiteln näher charakterisiert werden soll.

### 2.3.3 Das Cre/lox-Rekombinationssystem

Wie bereits der Name erkennen lässt, vermittelt die 38kDa große Cre-Rekombinase (Cre = **c**auses **r**ecombination) die Rekombination zwischen zwei identischen Erkennungssequenzen, den *loxP*-Elementen (*loxP* = **l**ocus of crossing over (**x**) aus **P**1). Die Erkennungssequenz ist 34bp lang. Sie setzt sich aus zwei invertierten Wiederholungen („inverted repeats“, 13bp) und einer asymmetrischen Kernsequenz („spacer“, 8bp) zusammen (siehe Abb. 2.3-d). Der „spacer“ gibt der *loxP*-Sequenz eine Orientierung, die für das Ergebnis der Rekombination von Bedeutung ist.



**Abb. 2.3-d Spezifische Bindung der Cre-Moleküle an die „inverted repeats“ der *loxP*-Erkennungssequenz mit Angriff durch das nukleophile Tyrosin<sub>324</sub> zwischen der 1. und 2. Base in der „spacer“-Region, Abb. verändert nach Guo et al., 1997, Fig. 1c).**

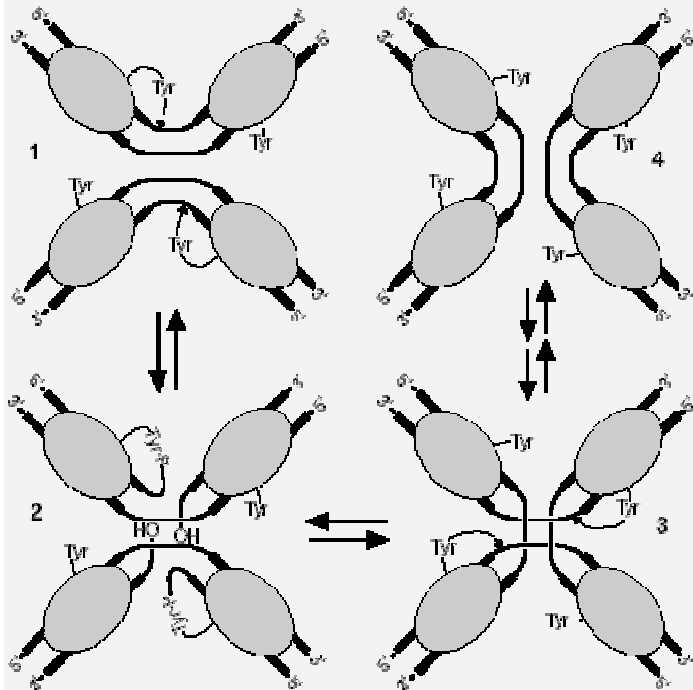
Für die Rekombination werden außer bivalenten Kationen keine weiteren Faktoren benötigt. Das Enzym fungiert als Topoisomerase und ist in der Lage, jede Form doppelsträngiger DNA innerhalb der *loxP*-Sequenz einer der Stränge zu schneiden, unabhängig von der DNA-Topologie. Als Substrat können sowohl relaxierte oder superspiralisierte zirkuläre DNA (z.B. Plasmide) als auch linearisierte DNA (z.B. Chromosomen) dienen (2, 65). Die katalytischen Aminosäuren der Cre-Rekombinase (344 As), welche in allen Integrasen konserviert vorliegen, sind Arginin<sub>173</sub> (Arg<sub>173</sub>), Histidin<sub>289</sub> (His<sub>289</sub>), Arginin<sub>292</sub> (Arg<sub>292</sub>), Tryptophan<sub>315</sub> (Trp<sub>315</sub>) sowie das nukleophile Tyrosin<sub>324</sub> (Tyr<sub>324</sub>) (57). Diese Aminosäuren sind essentiell für das Schneiden, Austauschen und Ligieren der DNA. Die Energie der Phosphat-Bindung bleibt während des Prozesses konserviert („Umesterung“). Die Cre-Rekombinase bindet als Dimer jeweils an die „inverted repeats“ der *loxP*-Sequenz. Insgesamt sind vier Cre-Moleküle an der Rekombination beteiligt. Der genaue Verlauf der ortsgerichteten Rekombination ist detailliert in Abb. 2.3-e erklärt.

1. Die nukleophile Hydroxylgruppe (-OH) des konservierten Tyrosin-Restes (Tyr<sub>324</sub>) greift die *loxP*-Sequenz an, dies führt zur Ausbildung einer 3'-Phosphotyrosin-Bindung.

2. Die freigewordene 5'-OH-Gruppe agiert als Nukleophil und greift wiederum die entstandene Phosphotyrosin-Bindung des anderen Reaktionspartners an.

3. Daraus resultiert die Entstehung einer Holliday-Struktur als Zwischenstufe.

4. Die Spaltung des Intermediates und der Strangaustausch führen zu den rekombinierten Produkten.



**Abb. 2.3-e Reaktionsmechanismus des Cre/lox-Rekombinationssystems.** Die Cre-Rekombinase (graue Ellipse) mit dem aktiven Tyrosin-Rest (Tyr<sub>324</sub>) bindet an die *loxP*-Erkennungssequenzen. (Die Abbildung wurde aus Guo et al., 1997 Fig 1a) entnommen).

## Mögliche Reaktionswege der ortsgerichteten Rekombination

Wie bereits erwähnt, besitzt die *loxP*-Sequenz eine asymmetrische Kernsequenz. Die Orientierung der beiden *loxP*-Erkennungssequenzen zueinander ist für das Rekombinationsergebnis entscheidend. In Abb. 2.3-f sind die möglichen Reaktionswege dargestellt. Entgegengesetzte Erkennungssequenzen auf dem gleichen DNA-Molekül (in *cis* wie unter Teil A) gezeigt, führen zur Inversion der dazwischen liegenden DNA. Die Reaktion ist reversibel. Erkennungssequenzen, welche auf unterschiedlichen DNA-Molekülen (in *trans*) liegen, können zur Translokation führen (siehe unter Teil B). Eine direkte Orientierung der beiden *loxP*-Sequenzen (in *cis*, siehe Teil C) führt zur Exzision der dazwischen liegenden DNA-Region in Form von zirkulärer DNA. Die durch die Cre erzeugte Deletion ist ebenfalls reversibel. Die Integration einer zirkulären extrachromosomalen DNA ist möglich, aber erschwert, da die intermolekulare Reaktion (Exzision) kinetisch günstiger ist als die intrachromosomale Reaktion (Integration).

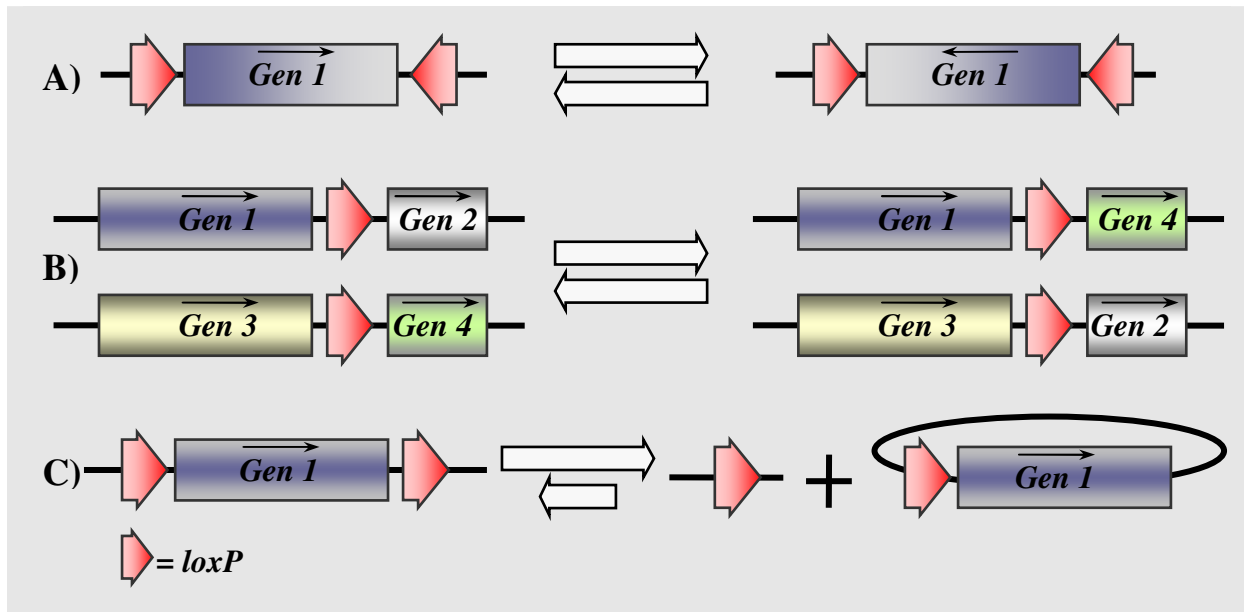


Abb. 2.3-f Rekombinationswege vermittelt durch die Cre-Rekombinase (nicht abgebildet). A) Inversion. B) Translokation. C) Exzision/Integration.

### Heterospezifische *lox*-Erkennungssequenzen stabilisieren die Integration

Durch die Verwendung von heterospezifischen *lox*-Sequenzen und der zeitlich begrenzten Cre-Expression kann das Gleichgewicht zugunsten der Integrationsreaktion verschoben werden und es entsteht eine Möglichkeit für die gezielte und stabile Integration von Plasmid-DNA in das gewünschte Wirtsgenom.

Die heterospezifischen *lox*-Sequenzen wurden mit Hilfe von Mutationsanalysen identifiziert. So können z.B. Mutationen innerhalb der 13bp langen „inverted repeat“-Sequenz die Affinität der Cre-Rekombinase zu ihrer Erkennungssequenz reduzieren. Durch die Verwendung von *lox*-Sequenzen, die am rechten Arm (*lox66*) bzw. am linken Arm (*lox71*) soweit verkürzt sind, dass sie gerade noch miteinander rekombinieren, kann die Rückreaktion in der resultierenden Doppelmutante (*lox66/lox71*) und der entstandenen chimären *loxP*-Sequenz dagegen nicht mehr stattfinden (3). Mutationen innerhalb der „spacer“-Region beeinflussen dagegen die Spezifität der Rekombination. *lox*-Sequenzen, die sich in nur einer Base (z.B. *lox511*, siehe Abb. 2.3-g) unterscheiden, zeigen eine deutlich reduzierte Effizienz mit der *loxP*-Sequenz zu rekombinieren, dabei wirken sich Basensubstitutionen auf den Positionen zwei bis sieben besonders stark aus. Homologe Sequenzen (*lox511*) werden dagegen weiterhin als Substrat von der Cre-Rekombinase erkannt und miteinander rekombiniert (66). Doppelmutationen innerhalb der „spacer“-Region sind stringenter als Einzelmutationen. Die Sequenzen *lox2272* und *lox5171* (siehe Abb. 2.3-g, in den folgenden Kapiteln als *loxAC* und *loxGA* bezeichnet) rekombinieren ausschließlich mit ihrer identischen Sequenz, nicht aber mit der Wildtypsequenz *loxP* (89).

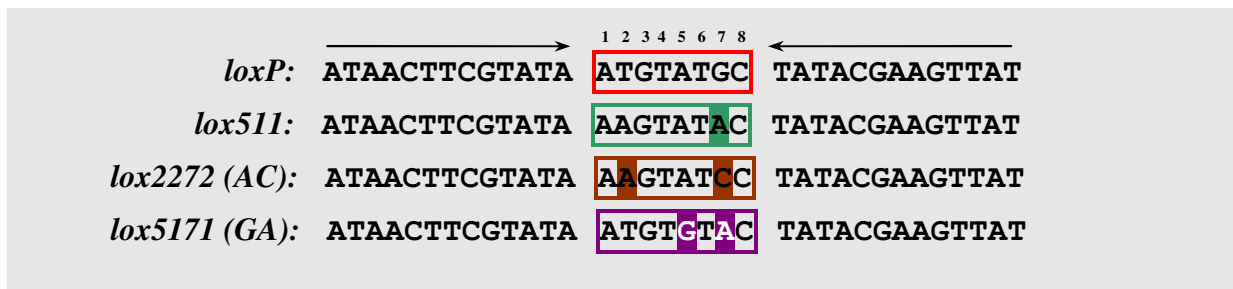


Abb. 2.3-g Wildtyp *loxP* und *lox*-Sequenzen mit Basenaustauschen in der „spacer“-Region.

## Generierung von *lox*-Erkennungssequenzen im Genom

Aufgrund der Länge von 34bp ist es relativ unwahrscheinlich, dass sich natürliche *lox*-Erkennungssequenzen im eukaryontischen Genom befinden, auch wenn in *E. coli*, Hefe und Säugerzellen kryptische *lox*-Sequenzen identifiziert wurden (139, 159, 168). Die Untersuchung heterospezifischer *lox*-Sequenzen hat aber gezeigt, dass die Cre-Rekombinase nur *lox*-Sequenzen mit nahezu identischen „spacer“-Regionen rekombiniert. Die Spezifität der Cre-Rekombinase macht also die Generierung geeigneter *lox*-Erkennungssequenzen im Wirtsgenom notwendig, wenn man ein Transgen gerichtet integrieren will. In Säugerzellen kann die Integration gezielt mittels homologer Rekombination erfolgen (82, 105). In Pflanzen ist die gerichtete Integration noch immer erschwert, obwohl die homologe Rekombination sich als „gene targeting“-Methode zu etablieren beginnt (60, 76, 167). Für die Einführung der Erkennungssequenz wird bisher die ungerichtete Transformation verwendet, was eine genaue Analyse der so generierten *lox*-Transformanten erfordert (24, 73, 155). Wurden aber Transformanten identifiziert, die eine stabile Genstruktur und *lox*-Integration zeigen, können diese wiederholt für die ortsgerichtete Rekombination verwendet werden.

## Verfügbarkeit der Cre-Rekombinase

Die Bereitstellung der Cre-Rekombinase in eukaryontischen Zellen kann auf verschiedene Weise stattfinden, beispielsweise durch die direkte Einführung des aufgereinigten Cre-Proteins mit Hilfe der Elektroporation oder durch die Integration eines *cre*-Expressionsvektors in das Genom (6, 83). Dabei hat sich die transiente Verfügbarkeit der Rekombinase für die strukturelle Stabilität der Rekombinationsprodukte von Vorteil erwiesen (Verhinderung der Rückreaktion bzw. Exzision). Eine kurzzeitige Expression der Cre-Rekombinase kann z.B. durch die zusätzliche Verwendung von *lox*-Sequenzen im *cre*-Expressionsvektor erreicht werden. Bei dieser „Selbsteliminierungs“-Strategie befindet sich das *cre*-Gen selbst zwischen zwei identischen *lox*-Sequenzen, was zum Herausschneiden der eigenen kodierten Sequenz und zur Inaktivierung des Gens führt (98, 152). Eine weitere



Möglichkeit besteht in der kontrollierten Expression der Cre-Rekombinase mit Hilfe eines induzierbaren Promotors oder der Kombination beider Strategien (23, 67, 172).

### **2.3.4 Anwendungsmöglichkeiten des Cre/*lox*-Rekombinationssystems**

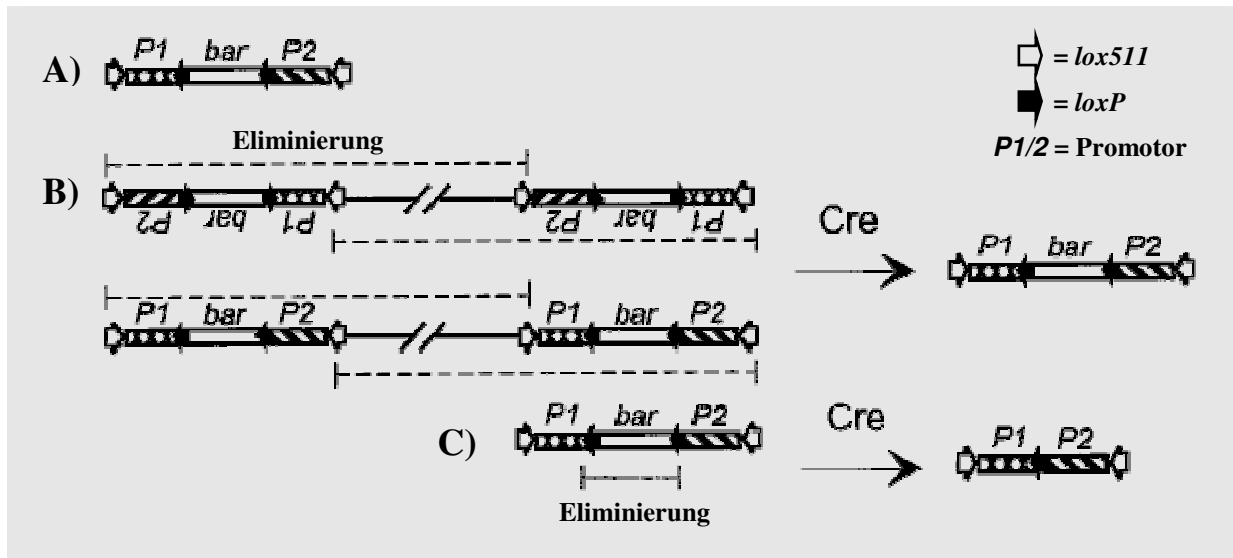
Die Einfachheit, Spezifität und Effizienz des Cre/*lox*-Rekombinationssystems haben zu einer breiten Anwendung als molekulares Werkzeug in pro- und eukaryontischen Organismen geführt:

#### **Eliminierung von Selektionsmarkern**

Bei der Einführung von rekombinanten Genen, die keinen selektierbaren Phänotyp besitzen, ist die zusätzliche Integration eines Selektionsmarkers nötig, der zu einer Anreicherung rekombinanter Transformanten führt. Dafür können z.B. Auxotrophiemarker verwendet werden, welche eine Mutation im Stoffwechsel komplementieren. Alternativ werden Resistenzgene gegen Antibiotika als Selektionsmarker verwendet. Deren Auswahl ist aber in eukaryontischen Systemen beschränkt. Zudem ist die Existenz des Markers im Genom nach erfolgreicher Integration des gewünschten Gens nicht mehr notwendig. Der Selektionsmarker könnte nach vorheriger Entfernung in einer späteren Transformationrunde wieder verwendet werden. Nicht zuletzt ist die Entwicklung neuer wirksamer Selektionsmarker zeit- und kostenintensiv. Sowohl in Hefe, Säugerzellen und in Pflanzen wird die Markereliminierung mit Hilfe des Cre/*lox*-Systems bereits angewandt (24, 138, 140, 156).

#### **Auflösung komplexer Mehrfachinsertionen**

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die mögliche Auflösung komplexer Mehrfachinsertionen, die oftmals mit ungerichteten Transformationsmethoden einhergehen (z.B. beim „particle gun“-Verfahren). Die Integration von Einfachkopien ist ein seltenes Ereignis und es erfordert einen hohen Analysenaufwand dementsprechende Transformanten zu identifizieren. In Weizen wurde mit Hilfe des Cre/*lox*-Systems ein Zielvektor konstruiert, der zur Auflösung von Mehrfachinsertion führt sowie zur gleichzeitigen Eliminierung des Selektionsmarkers (siehe Abb. 2.3-h (155)).



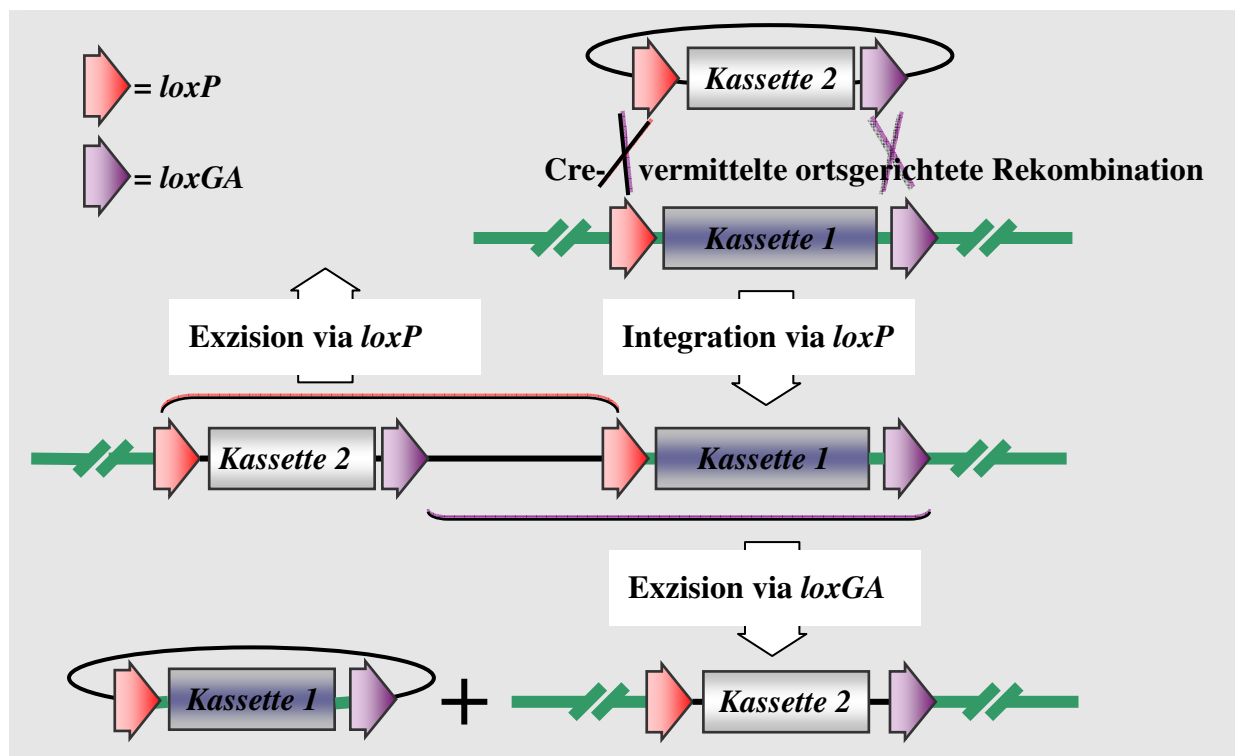
**Abb. 2.3-h Auflösung komplexer Mehrfachinsertionen (Concatemeren) und Markereliminierung.** A) Transformationsvektor. B) Rekombination einer Mehrfachinsertion zwischen den außen liegenden *lox511*-Sequenzen (gleiche Orientierung) für verschiedene Integrationsmuster führt zur Einfachinsertion. C) Eliminierung des Resistenzgens *bar* zwischen den *loxP*-Sequenzen (gleiche Orientierung) resultiert in einer Einfachinsertion ohne Resistenzgen (entnommen aus Srivastava et al., 1999 Fig. 1b) und verändert).

Der Transformationsvektor wurde dabei so gewählt, dass die gesamte Expressionskassette von zwei umgekehrt orientierten *lox511*-Sequenzen flankiert wird. Das Resistenzgen *bar* (Resistenz gegen Bialaphos) wird zwischen zwei gleich orientierte *loxP*-Sequenzen positioniert (siehe Abb. 2.3-h Teil A). Unabhängig von der Orientierung der einzelnen Kopien kommt es zur Auflösung der Mehrfachinsertionen durch die äußeren gleich orientierten *lox511*-Sequenzen (siehe Teil B). Das Resistenzgen, welches zwischen den *loxP*-Sequenzen liegt, wird ebenfalls eliminiert (siehe Teil C). Diese Methode setzt eine Mehrfachinsertion am selben Genlocus voraus. Kommt es zur Insertion chromosomaler DNA zwischen den Transgenen, wie sie u.a. bei der Transformation von Hafer beschrieben wurde (119), kann es zu deren Deletion kommen, welche lethal sein kann. Ein weiterer Nachteil ist die Lokalisierung des resultierenden einfachen Transgens zwischen den umgekehrt orientierten *lox511*-Sequenzen, da es dadurch zur Translokation der Expressionskassette kommen kann. Die Transgene können dann in Abhängigkeit von ihrer Orientierung im Genom unterschiedliche Expressionslevel haben. Trotz dieser Einschränkung stellt diese Methode eine Möglichkeit dar, Genstilllegungsmechanismen infolge von Mehrfachinsertionen wieder aufzuheben, wie u.a. in *Arabidopsis* gezeigt (27).

### Gezielte Integration an einen definierten Genlocus

Neben der Eliminierung von unerwünschten DNA-Sequenzen, liegt das größte Potential des Cre/lox-Rekombinationssystems in der gezielten Integration von Transgenen in das Wirtsgenom. Damit besteht u.a. die Möglichkeit, gut charakterisierte Genorte wieder zu verwenden. Day et al. konnten die Vermutung bestätigen, dass die Integration an demselben Genlocus zu ähnlichen Expressionleveln führt (26). Somit können Positionseffekte, die sowohl die Stabilität als auch die Höhe der Expression rekombinanter Gene stark beeinflussen, reduziert werden (44). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Transformationsrate für die ungerichtete Integration im Vergleich zur ortsgerichteten Integration deutlich verringert war (3).

Der durch die Cre-Rekombinase vermittelte Kassettenaustausch (RMCE = “recombinase mediated cassette exchange“) wird bereits in Säugerzellen erfolgreich verwendet (11, 33). Diese Methode ermöglicht infolge eines doppelten „crossing overs“ die alleinige Integration der rekombinanten DNA ohne Vektorrückgrad. Der Einfluss bakterieller Sequenzen kann somit ausgeschlossen werden. Unter Verwendung heterospezifischer *lox*-Sequenzen kann ein gezielter Austausch von extrachromosomaler DNA mit dem Genom erfolgen. Der Kassettenaustausch ist schematisch als Zweistufenprozess (bimolekulare Integrationsreaktion gefolgt von unimolekularer Eliminierung) in der folgenden Abbildung dargestellt.



**Abb. 2.3-i Cre-Rekombinase vermittelter Kassettenaustausch** dargestellt als Zweistufenprozess. Die Integration des Plasmids ist für die Rekombination der *loxP*-Sequenzen abgebildet (Integration zuerst über *loxGA* ist ebenfalls möglich).

Die Rekombination der *lox*-Sequenz eines zirkulären Plasmids (Kassette 2 für *loxP* dargestellt, Rekombination zuerst über *loxGA* ist ebenfalls möglich) mit einer identischen Erkennungssequenz im Genom (bereits integrierte Kassette 1) führt zu dessen Integration. Das zweite Rekombinationsereignis kann in Abhängigkeit von den beteiligten *lox*-Sequenzen wieder zum Herausschneiden der gerade integrierten Kassette 2 (durch die Rekombination von *loxP*) oder aber zur Eliminierung der chromosomalen Kassette 1 führen (Rekombination der *loxGA*). Alternativ zum Zweistufenprozess könnte der Kassettenaustausch auch infolge eines simultanen doppelten „crossing overs“ stattfinden. Die Form des Substrates (zirkulär oder linearisierte Plasmid-DNA) ist für den Reaktionsweg entscheidend, das Produkt ist für beide identisch.

Wie bereits bei der homologen Rekombination beschrieben, liegt auch beim Cre-Rekombinase vermittelten Kassettenaustausch die Herausforderung in der optimalen Vektorkonstruktion, welche eine Selektion für spezifische Rekombinationsereignisse zulässt und gleichzeitig ungerichtete Integrationen eliminiert.

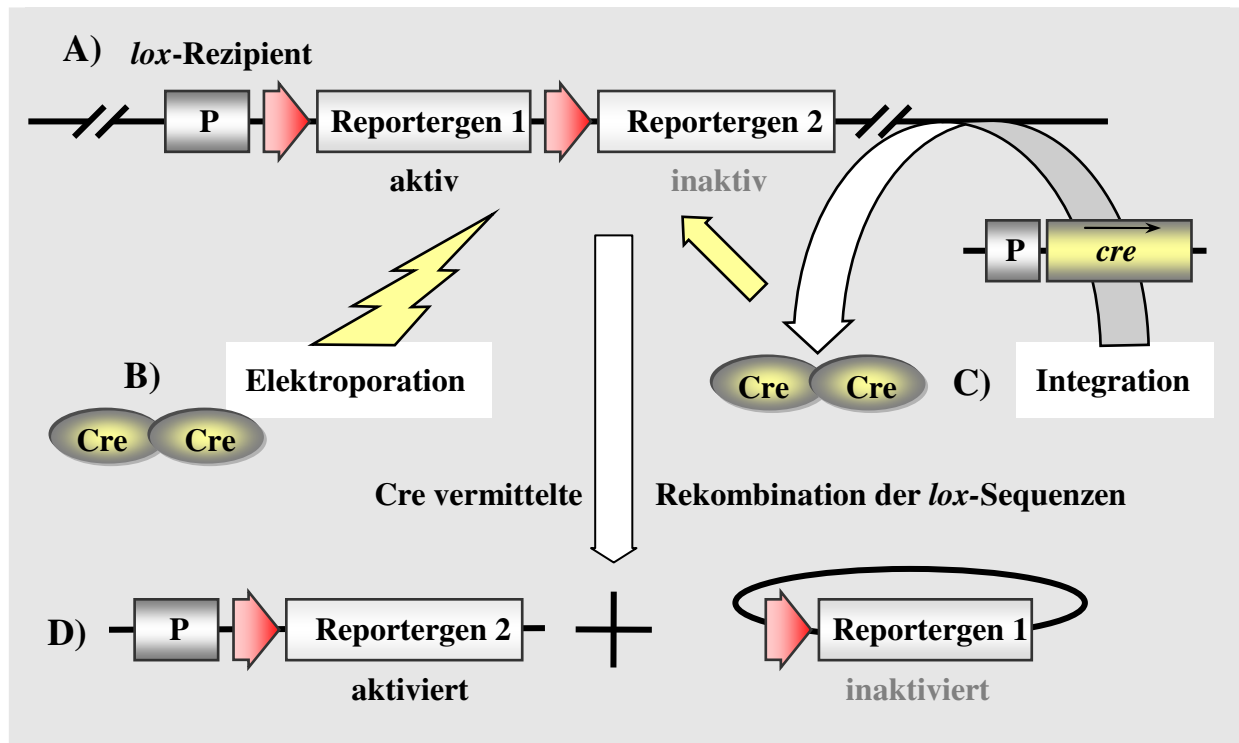
## 2.4 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit ist die Etablierung eines Cre/*lox*-Rekombinationssystems in *C. reinhardtii*, welches die gezielte Modifikation des *Chlamydomonas*-Kerngenoms ermöglicht. Voraussetzungen für die ortsgerichtete Rekombination sind zum einen die Integration von *lox*-Erkennungssequenzen in das Genom und zum anderen die Bereitstellung der Cre-Rekombinase im Zellkern dieser *lox*-Transformanten.

Zu Beginn der Arbeit sollte mit Hilfe der ungerichteten Transformation ein geeigneter *lox*-Rezipientenstamm in *C. reinhardtii* generiert werden. An diesen Stamm wurden die folgenden Anforderungen gestellt:

- ✓ keine Beeinflussung der Genexpression durch das Einbringen der *lox*-Erkennungssequenz in die Expressionskassette.
- ✓ einfache Selektion positiver Transformanten nach erfolgter Integration der *lox*-Expressionskassette mit Hilfe eines Reportergens.
- ✓ einfache Unterscheidungsmöglichkeit für den Zeitpunkt vor und nach einer erfolgten Cre/*lox*-vermittelten Rekombination mit Hilfe eines weiteren Reportergens.

Der dafür geplante Rekombinationsassay (siehe Abb. 2.4-a) basiert auf der Eliminierung eines Reportergens 1, welches sich zwischen zwei *lox*-Erkennungssequenzen gleicher Orientierung befindet. Durch das Herausschneiden des Reportergens mit Hilfe der Cre/*lox*-vermittelten Rekombination kommt es zur Aktivierung eines zweiten zuvor promotorlosen Reportergens, welches sich direkt „downstream“ der *lox*-Expressionskassette befindet.



**Abb. 2.4-a Rekombinationsassay zur Überprüfung der Cre/*lox* spezifischen Rekombination in *C. reinhardtii*.** A) *lox*-Rezipientenstamm mit dem aktiven Reportergen 1, den *lox*-Sequenzen (dargestellt als roter Pfeil) und dem inaktiven Reportergen 2. B) Einführung der Cre-Rekombinase als gereinigtes Protein mittels Elektroporation (gelber gezackter Pfeil) oder C) als *cre*-Expressionvektor durch Integration in das Genom. D) *lox*-Rezipient nach erfolgreicher Rekombination.

Für die Bereitstellung der Cre-Rekombinase in *C. reinhardtii* sollten zwei Möglichkeiten untersucht werden. Zum einen die direkte Einführung des aus *E. coli* gereinigten Cre-Proteins mit Hilfe der Elektroporation und zum anderen die Integration eines *cre*-Expressionsvektors in das *C. reinhardtii*-Genom (siehe Teil B und C).

### 3 ERGEBNISSE

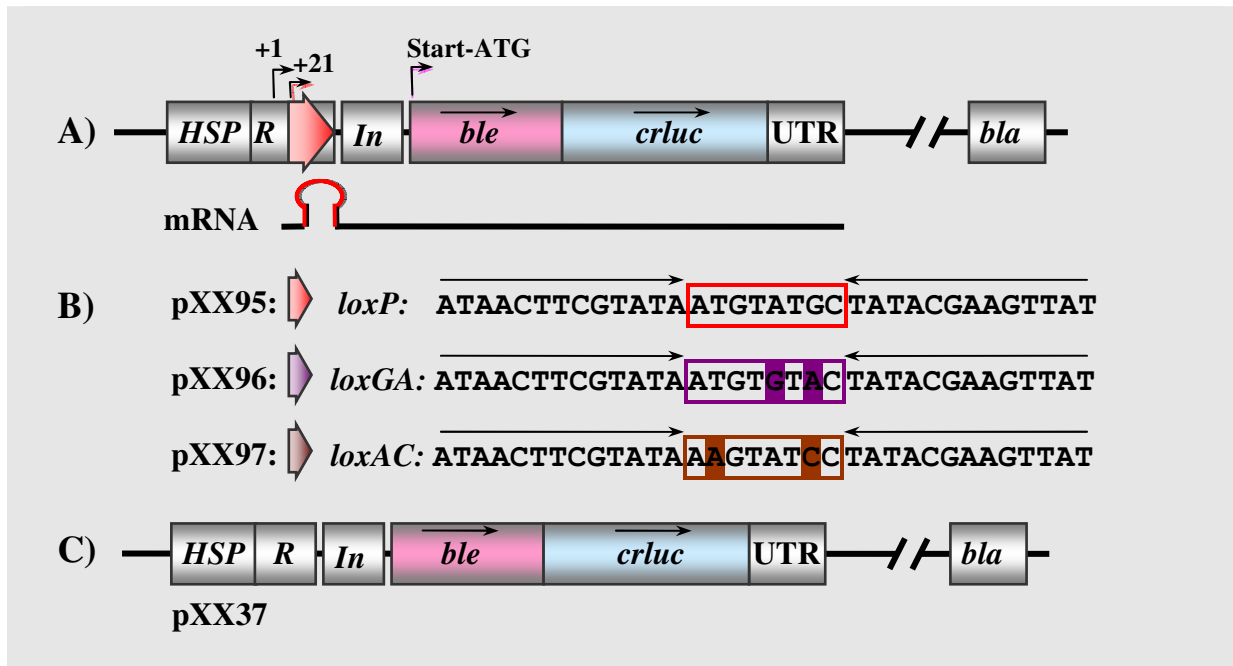
#### 3.1 Integration von *lox*-Erkennungssequenzen in *C. reinhardtii*

##### 3.1.1 Überprüfung des Einflusses einer *lox*-Sequenz auf die Genexpression

Für eine ortsgerichtete Rekombination durch die Cre-Rekombinase mussten zuerst die dazu notwendigen Erkennungssequenzen, die so genannten *lox*-Sequenzen, in einen geeigneten Vektor und dann in das Algen genom integriert werden. Dafür wurde sowohl der Einfluss der Wildtypsequenz *loxP*, als auch der der mutierten Sequenzen *loxGA* und *loxAC* auf die Expression eines Reportergens überprüft. Die *lox*-Sequenzen unterscheiden sich nur innerhalb der „spacer“-Region, die flankierenden Bereiche („inverted repeats“) sind identisch. Es wurden verschiedene Positionen innerhalb der nichtkodierenden Sequenz des *RBCS2*-Gens (Genbank, X004472) ausgewählt, siehe Abb. 3.1-a und Abb. 3.1-b. Als Reportergen wurde das Fusionsgen *ble-crluc* verwendet. Dies ermöglichte eine einfache Selektion der Transformanten auf Zeozinresistenz, vermittelt durch das *ble*-Gen. Des Weiteren konnten resistente Transformanten zusätzlich mittels Lumineszenzmessung auf Luciferaseexpression (*crluc*) überprüft werden.

##### Expressionsvektoren mit *lox*-Sequenz in der *RBCS2*-Promotorregion

Um einen möglichen Einfluss der *lox*-Sequenzen auf die Genexpression in *C. reinhardtii* zu überprüfen, wurden die Expressionsvektoren pXX95, pXX96 und pXX97 verwendet. Das Fusionsgen *ble-crluc* stand dabei unter der Kontrolle des *HSP70A/RBCS2*-Tandempromotors mit Intron1 (HSP-R-In) und der 3'-UTR des *RBCS2*-Gens (41). Die Erkennungssequenzen *loxP*, *loxGA* und *loxAC* wurden in die 5'-UTR des *RBCS2*-Gens integriert. Dafür wurde an Position 1125 (vgl. Genbank: X04472) durch die Einführung einer Punktmutation (G zu T) eine *EcoRI*-Schnittstelle generiert, in die anschließend der jeweilige *lox*-„linker“ integriert wurde. Die *lox*-Sequenzen befanden sich bei Position +21 „downstream“ vom Transkriptionsstart (+1) auf der mRNA (siehe Abb. 3.1-a Teil A). Als Kontrolle diente das Plasmid pXX37 (entspricht pRbcBRL(HSP196), (41)), welches sich nur durch eine fehlende *lox*-Sequenz im Promotorbereich unterschied, siehe Abb. 3.1-a Teil C.

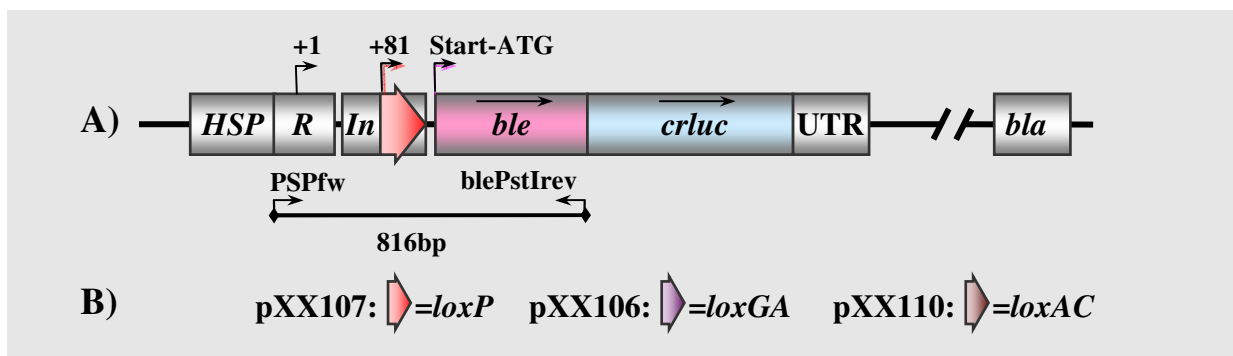


**Abb. 3.1-a Expressionsvektoren mit *lox*-Sequenz in der Promotorregion.** A) Expressionskassette mit *lox*-Sequenz an Position +21 „downstream“ vom Transkriptionsstart (+1) des *RBCS2*-Promotors. Die Plasmide pXX95, 96 und 97 haben die gleiche Expressionskassette. Darunter ist die mögliche „stem-loop“-Struktur in der mRNA dargestellt. HSP-R-In = *HSP70A/RBCS2*-Tandempromotor mit Intron1, UTR = 3'-UTR des *RBCS2*-Gens, *bla* = Ampicillinresistenzgen, *ble-crluc* = *ble*-codonoptimiertes Luciferase-Fusionsgen. B) Die Plasmide pXX95, 96 und 97 unterscheiden sich nur in der *lox*-Sequenz (dargestellt als Pfeil: rot = *loxP*, lila = *loxGA* und braun = *loxAC*). Die ausgetauschten Nukleotide in der „spacer“-Region (eingerahmt) sind im Vergleich zum Wildtyp *loxP*, lila (*loxGA*) und braun (*loxAC*) hinterlegt. C) Als Kontrolle für den Transformationserfolg diente das Plasmid pXX37.

Die Transformation vom Chlamydomonas-Stamm *cw15Arg<sup>-</sup>A* erfolgte wie unter 6.2.3 beschrieben unter Selektion auf Zeozin (5µg/ml). Nach 14 Tagen konnten nur für das Kontrollplasmid pXX37 *ble<sup>+</sup>*-Transformanten erhalten werden, welche zusätzlich auf ihre Luciferaseaktivität hin untersucht wurden (siehe 6.4.4.1). Alle untersuchten zeozinresistenten Transformanten exprimierten auch die Luciferase (nicht gezeigt). Der Versuch wurde dreimal mit dem gleichen Resultat wiederholt. Da die Expressionskassetten von pXX37 und pXX95, pXX96 und pXX97 bis auf die *lox*-Sequenz völlig identisch waren, scheint es durch die Ausbildung einer Sekundärstruktur in der mRNA („stem-loop“-bedingt durch die „inverted repeats“ innerhalb der *lox*-Sequenz) am 5'-Ende der nichtkodierenden Region des *RBCS2*-Promotors zu einer Inhibierung der Genexpression zu kommen (84, 91).

### Integration von *lox*-Sequenzen in das Intron1 des *RBCS2*-Gens

Da sich die 5'-UTR der Promotorregion des *RBCS2*-Gens für die Integration der *lox*-Sequenz als ungeeignet herausstellte, wurden bei den Expressionsvektoren pXX110, pXX106 und pXX107 die *lox*-Sequenzen in das Intron1 der Expressionskassette integriert (siehe Abb. 3.1-b). Dafür wurde an Position 1342 im Intron1 des *RBCS2*-Gens durch Insertionsmutagenese wieder eine *EcoRI*-Schnittstelle erzeugt, in welche die *lox*-Sequenzen ligiert wurden. Aufgrund des Herausspleißens der Intronsequenz sollte in der mRNA keine *lox*-verursachte Sekundärstruktur mehr vorliegen. Die Expressionskassetten sind zu den vorherigen Vektoren pXX95, pXX96 und pXX97 ansonsten identisch.

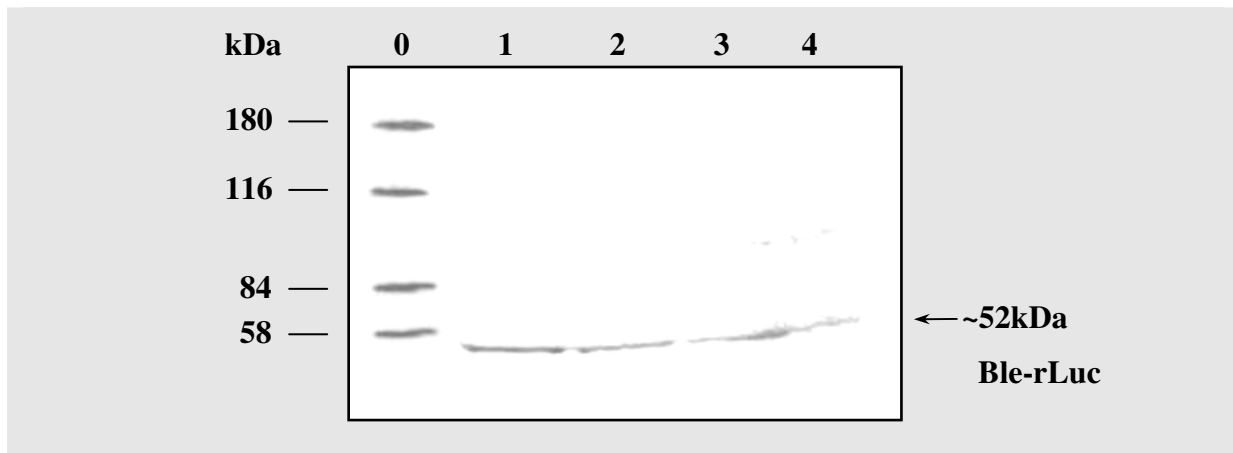


**Abb. 3.1-b Expressionsvektoren mit der *lox*-Sequenz im Intron1 der Expressionskassette.** A) *lox*-Sequenz beginnt bei Position +81 „downstream“ vom Transkriptionsstart (+1) des *RBCS2*-Promotors. B) Die Plasmide pXX106, pXX107 und pXX110 sind, mit Ausnahme der *lox*-Sequenz im Intron1, wie das Plasmid pXX37 aufgebaut. Zur Überprüfung von *ble*<sup>+</sup>-Transformanten wurde die genomische PCR (Oligonukleotide: PSPfw und blePstIrev) verwendet. Bei vollständiger Integration des Expressionsvektors sollte ein 816bp großes PCR-Produkt amplifiziert werden.

Die Transformation der Expressionsvektoren pXX106, pXX107 und pXX110 sowie des Kontrollplasmids pXX37 erfolgte wiederum im Stamm *cw15Arg<sup>-</sup>A*. Für alle Konstrukte konnten positive Transformanten auf Zeozin (5µg/ml) selektiert werden. Zur weiteren Analyse wurden sie in Flüssigmedium angeimpft und auf Luciferaseaktivität überprüft. Alle untersuchten zeozinresistenten Transformanten exprimierten auch die Luciferase (nicht gezeigt). Von jeweils einer Ble-crLuc-positiven Transformante wurde die genomische DNA nach 6.3.2.2 isoliert und mittels genomischer PCR untersucht. Die PCR-Reaktion (Oligonukleotide PSPfw und blePstIrev, siehe Abb. 3.1-b) ergab ein 816bp großes Produkt über den *RBCS2*-Promotorbereich und das vollständige *ble*-Gen (PCR nicht gezeigt). Zur weiteren Überprüfung wurde das aufgereinigte PCR-Produkt sequenziert. Alle Transformanten *cw15Arg<sup>-</sup>A*-106 (*loxGA*), -107 (*loxP*), -110 (*loxAC*) enthielten die entsprechende *lox*-Sequenz im Intron1, *cw15Arg<sup>-</sup>A*-37 zeigte das unveränderte Intron1 vor dem *ble*-Gen. Die korrekte Expression des Ble-rLuc-Fusionsproteins wurde zusätzlich immunologisch nachgewiesen. Für einen Western Blot wurden 2ml Algenkultur der



jeweiligen Transformante eingesetzt. Die Auftrennung des Proteingemisches erfolgte mittels SDS-PAGE in einem 10% igen Polyacrylamidgel. Die Detektion des Proteins wurde mit einem kommerziell erhältlichen anti-*Renilla*-Luciferase-Antikörper durchgeführt und dieser Primärantikörper durch ein anti-Maus-IgG-Alkalische-Phosphatase-Konjugat gebunden. Nach einer standardmäßigen Farbreaktion konnte die erwartete Bande bei ca. 52kDa (Abb. 3.1-c) in der richtigen Größe nachgewiesen werden.

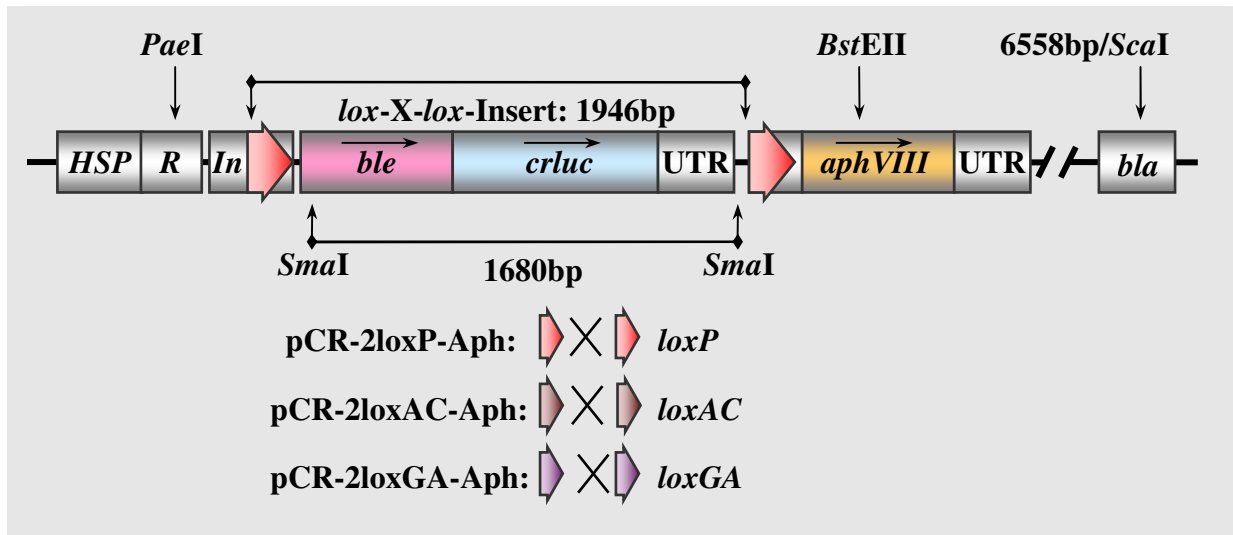


**Abb. 3.1-c Western Blot auf Ble-rLuc exprimiert in *cw15Arg<sup>+</sup>A*-Transformanten.** Spur 0) Proteinstandard, 1) *cw15Arg<sup>+</sup>A*-37 als Positivkontrolle, 2) *cw15Arg<sup>+</sup>A*-106 (*loxGA*), 3) *cw15Arg<sup>+</sup>A*-107 (*loxP*) und 4) *cw15Arg<sup>+</sup>A*-110 (*loxAC*). Die Detektion erfolgte mit einem anti-*Renilla*-Luciferase-Antikörper (1:2000). Bei korrekter Expression sollte sich für das Ble-rLuc-Protein eine Größe von 52kDa ergeben.

Aufgrund der korrekten Expression des Fusionsproteins wurde die *lox*-Erkennungsequenz für die Cre-Rekombinase in den folgenden Versuchen standardmäßig im Intron1 des HSP-R-In-Tandempromotors integriert.

### 3.1.2 Etablierung eines *lox*-Vektors für den Rekombinationsassay

Um die Aktivität der Cre-Rekombinase in *C. reinhardtii* nachweisen zu können, wurde ein einfach zu detektierendes Reportersystem benötigt. Ausgehend von den zuvor beschriebenen *lox*-Vektoren pXX106, pXX107 und pXX110 wurde zusätzlich zu der *ble-crluc*-Kassette mit der *lox*-Sequenz im Intron1 ein zweiter Selektionsmarker eingeführt. Dafür wurde *aphVIII* für die Resistenz gegen Paromomycin verwendet (153). Dieses zweite Resistenzgen wurde ohne Promotor, aber zusammen mit einer zweiten identischen *lox*-Sequenz in gleicher Orientierung und einem Teil des Intron1 (ab Position 1342) „downstream“ der 3'-UTR der *ble-crluc*-Expressionskassette gesetzt (siehe Abb. 3.1-d).



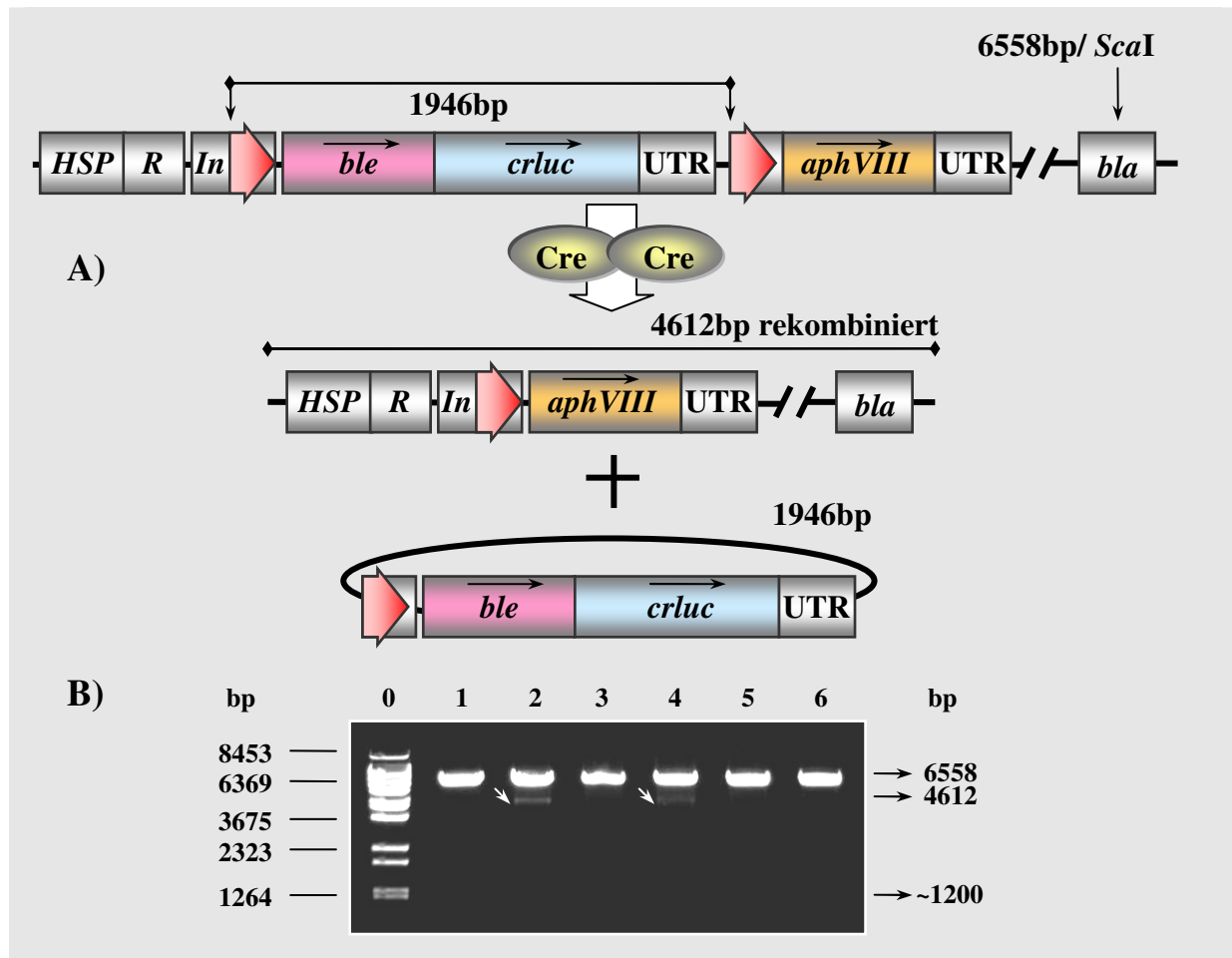
**Abb. 3.1-d *Lox*-Vektoren für den Rekombinationsassay.** Die Plasmide pCR-2loxP-Aph, pCR-2loxGA-Aph und pCR-2loxAC-Aph haben die gleichen Expressionskassetten: HSP-R-In-Tandempromotor mit einer *lox*-Sequenz im Intron1, *ble-cmluc*-Reportergen, 3'-UTR, zweite identische *lox*-Sequenz gleicher Orientierung (dargestellt als Pfeile gleicher Farbe und Richtung) mit dem 3'-Bereich des Intron1 und einem promotorlosen *aphVIII*-Gen mit 3'-UTR. Mit *ScaI*-linearisierte Vektoren waren 6558bp groß, das *lox-X-lox*-Insert umfasste 1946bp. Durch einen *SmaI*-Verdau und anschließender Religation kann das *lox-X-lox*-Insert um 1680bp verkleinert werden.

Die Verwendung der *lox*-Expressionsvektoren pCR-2loxP-Aph, pCR-2loxGA-Aph und pCR-2loxAC-Aph zur Überprüfung der Cre-Rekombinaseaktivität in *E. coli* und später in *C. reinhardtii* wird in den folgenden Kapiteln ausführlicher beschrieben.

### *In vitro* Rekombinationsassay

Mit Hilfe eines *in vitro* Rekombinationsassays wurden die Expressionsvektoren pCR-2loxP-APH, pCR-2loxGA-APH und pCR-2loxAC-APH vor ihrer weiteren Verwendung in *C. reinhardtii* und in *E. coli* bezüglich ihrer Rekombinierbarkeit analysiert (Abb. 3.1-e Teil A). Dafür wurden die Plasmide mit dem Restriktionsenzym *ScaI* linearisiert und das 6558bp große Fragment aufgereinigt. Im Rekombinationsassay zur Überprüfung der *lox*-Sequenzen wurden dann je 250ng linearisierte Plasmid-DNA mit 1U Cre-Rekombinase für 30min bei 37°C inkubiert. Parallel wurden die Kontrollreaktionen der linearisierten Plasmide mit ddH<sub>2</sub>O durchgeführt. Nach der Hitzeinaktivierung der Cre-Rekombinase wurde ein Aliquot von jeder Reaktion gelelektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 3.1-e Teil B). Die linearisierten Plasmide vor der Rekombination sind in Spur 1, 3, und 5 bei 6558bp zu sehen. Nach einer erfolgreichen Rekombination der beiden identischen *lox*-Sequenzen innerhalb einer linearen DNA-Sequenz sollte der rekombinierte Vektoranteil um 1946bp, der Bereich zwischen den *lox*-Sequenzen, kleiner sein. Die Bande ist schwach in Spur 2 für pCR-2loxP-APH rek. und in Spur 4 für pCR-2loxGA-APH rek. zu sehen. In Spur 6 für pCR-2loxAC-APH konnte unter stärkerer Belichtung die erwartete Bande identifiziert werden (nicht dargestellt). Die Bande der

herausgeschnittenen DNA bei 1946bp war in Spur 2, 4 und 6 ebenfalls nur nach Verstärkung zu erkennen, aufgrund ihrer zirkulären Konformation lief die Bande bei ca. 1200bp. Der Anteil der rekombinierten DNA ist im Vergleich zur Ausgangs-DNA gering, es konnte aber gezeigt werden, dass alle drei *lox*-Vektoren (pCR-2loxP-APH, pCR-2loxGA-APH und pCR-2loxAC-APH) *in vitro* von einer aktiven Cre-Rekombinase als Substrat erkannt werden.

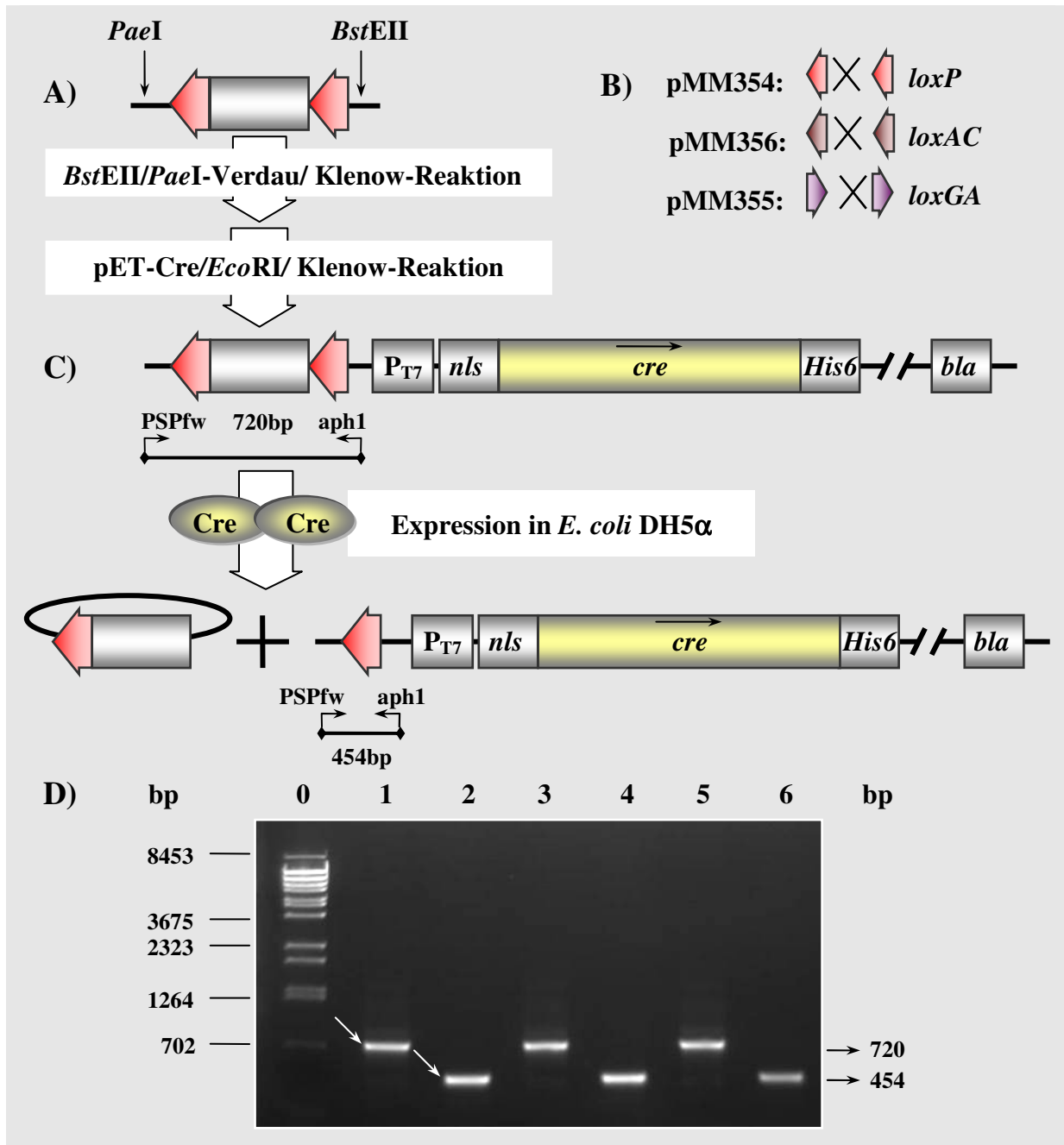


**Abb. 3.1-e A) In vitro Rekombinationsassay mit *lox*-Vektoren. B) Gelelektrophoretische Auftrennung:** Spur 0) DNA-Molekulargewichtsstandard, 1) pCR-2loxP-APH vor der Rekombination (v.d.R.), 2) pCR-2loxP-APH rekombiniert (rek.), 3) pCR-2loxGA-APH v.d.R., 4) pCR-2loxGA-APH rek., 5) pCR-2loxAC-APH v.d.R. und 6) pCR-2loxAC-APH rek..

Die Ergebnisse für die *lox*-Expressionsvektoren wurden durch den im Folgenden beschriebenen *in vivo* Rekombinationsassay abgesichert.

### ***In vivo* Rekombinationsassay in *E. coli***

Zusätzlich zum *in vitro* Rekombinationsassay wurden die *lox*-Expressionsvektoren noch *in vivo* in *E. coli* untersucht. Dafür wurden die jeweiligen *lox*-Expressionskassetten direkt in einen Cre-Rekombinase exprimierenden pET-Vektor (pET-Cre siehe Abb. 3.2-a) integriert. Um eine Analyse der rekombinierten und nichtrekombinierten *lox*-Expressionsvektoren unter identischen Reaktionsbedingungen mit Hilfe einer PCR durchführen zu können, wurden zuerst die *lox*-Vektoren mit *Sma*I verdaut und religiert (Abb. 3.1-d). Dies führte zu einer Verkleinerung des *lox*-X-*lox*-Inserts um 1680bp von ursprünglich 1946bp auf 266bp. Die resultierenden Plasmide (pMM354 aus pCR-2loxP-APH, pMM355 aus pCR-2loxGA-APH und pMM356 aus pCR-2loxAC-APH) wurden mit *Pae*I/*Bst*EII verdaut und mit Klenow-Fragment behandelt, die verkleinerten *lox*-X-*lox*-Inserts anschließend in pET-Cre (*Eco*RI/Klenow-Fragment) integriert, siehe Abb. 3.1-f. Als Kontrolle wurde der leere pET16b mit den jeweiligen *lox*-X-*lox*-Inserts ohne *cre*-Gen verwendet (pET-loxP-X-loxP). Die Transformation erfolgte im *E. coli* Stamm DH5 $\alpha$ , welcher das Gen für die T7-RNA-Polymerase nicht besitzt. Es kam aber trotzdem zu einer schwachen Expression des *cre*-Gens durch die *E. coli* eigene RNA-Polymerase und damit auch zur Rekombination der *lox*-Sequenzen (114). Die entstandenen Transformanten wurden mit einer Kolonie-PCR mit den Oligonukleotiden PSPfw und aph1 über den *lox*-Bereich (siehe Abb. 3.1-f unter Teil C und D) analysiert. Die schwache Expression der Cre-Rekombinase in DH5 $\alpha$  genügte, um das jeweilige *lox*-X-*lox*-Insert auf dem pET-Cre-Vektor vollständig zu rekombinieren, was zur Verkleinerung des entstehenden PCR-Produktes von 720bp (Kontrolle bzw. vor der Rekombination) zu 454bp führte. In allen Transformanten konnte nur das rekombinierte PCR-Produkt detektiert werden, d.h. eine erfolgreiche Transformation war gleichbedeutend mit einer erfolgreichen Rekombination.



**Abb. 3.1-f In vivo Rekombinationsassay in *E. coli* DH5α.** A) *BstEII/PaeI*-Verdau und Klenow-Reaktion von B) pMM354, pMM355, pMM356 sowie Integration in pET-Cre. C) Die Expression der Cre-Rekombinase führte zur Rekombination der *lox*-Sequenzen. D) PCR mit den Oligonukleotiden PSPfw und *aph1* der DH5α-Transformanten mit und ohne *cre*-Gen: Spur 0) DNA-Molekulargewichtsstandard, 1) pET-*loxP*-X-*loxP* als Negativkontrolle bei 720bp, 2) pET-Cre-*loxP* rekombiniert (rek.) bei 454bp, 3) pET-*loxGA*-X-*loxGA*, 4) pET-Cre-*loxGA* rek. 5) pET-*loxAC*-X-*loxAC* und 6) pET-Cre-*loxAC* rek.

Die isolierte Plasmid-DNA wurde von jeweils einem rekombinierten Klon und der Kontrolle durch Restriktionsanalyse und anschließender Sequenzierung über den *lox*-Bereich überprüft. Damit konnte sowohl die *in vivo* Aktivität der heterolog in *E. coli* exprimierten Cre als auch die Funktionalität der *lox*-Expressionsvektoren pCR-2*loxP*-APH, pCR-2*loxGA*-APH und pCR-2*loxAC*-APH gezeigt werden.

### 3.1.3 Integration von *lox*-Vektoren in das *C. reinhardtii*-Genom

Um die *lox*-Vektoren für den Rekombinationsassay in das Genom von *C. reinhardtii* zu integrieren, wurden die Algen jeweils mit den funktionsfähigen *lox*-Vektoren pCR-2loxP-APH, pCR-2loxGA-APH und pCR-2loxAC-APH und dem Kontrollplasmid pXX37 transformiert (vgl. Abb. 3.1-d). Die Selektion erfolgte auf Zeozin (5µg/ml). Die vollständige Charakterisierung der Transformanten war an dieser Stelle Voraussetzung für die erfolgreiche Umsetzung einer Rekombination in *C. reinhardtii*. Im Vordergrund dieses Experimentes stand deshalb die Suche nach Transformanten mit einer vollständigen Expressionskassette, einfacher Kopienzahl des Inserts, einer guten Expression des Reportergens *ble-crluc* und einem inaktiven *aphVIII*-Gen.

#### Überprüfung der *lox*-Vektoren in dem Stamm *cw15Arg<sup>-</sup>A*

Da in einem ersten Ansatz die Anzahl zeozinresistenter *lox*-Transformanten mit *lox*-Vektoren im Vergleich zur Positivkontrolle pXX37 relativ gering war, wurden die *cw15Arg<sup>-</sup>A*-Transformanten mit pCR-2loxP-APH, pCR-2loxGA-APH und pCR-2loxAC-APH aus zwei unabhängigen Transformationen zusammen untersucht. Die Kontrolle ergab für pXX37 72 Transformanten, die nicht weiter analysiert wurden. Alle zeozinresistenten *lox*-Transformanten wurden dagegen in 2ml Flüssigkultur und dem entsprechenden Antibiotikum, Zeozin (5µg/ml) bzw. Paromomycin (20µg/ml), angeimpft. Nach zwei Tagen Kultivierung erfolgte die Auswertung hinsichtlich der Expression der Reportergene *ble-crluc* und *aphVIII*.

<i>lox</i> -Transformanten <i>cw15Arg<sup>-</sup>A</i> -	Zeozin- resistenz [5µg/ml]	Luciferase- aktivität	Paromomycin- sensitivität [20µg/ml]	Phänotyp: Ble <sup>+</sup> -/rLuc <sup>+</sup> / AphVIII <sup>-</sup>
<b>2loxP-APH</b>	18/18	10/18	17/18	10/18
<b>2loxGA-APH</b>	17/17	11/17	17/17	11/17
<b>2loxAC-APH</b>	12/12	9/12	10/12	9/12

**Tab. 3.1-a Überprüfung von *lox*-Transformanten in *cw15Arg<sup>-</sup>A*.** Für den Stamm *cw15Arg<sup>-</sup>A*-2loxP-APH konnten zehn von 18 untersuchten Transformanten mit dem gesuchten Phänotyp zeozinresistent (Ble<sup>+</sup>), luciferaseaktiv (rLuc<sup>+</sup>) und paromomyzinsensitiv (AphVIII<sup>-</sup>) identifiziert werden, für *cw15Arg<sup>-</sup>A*-2loxGA-APH elf (Ble<sup>+</sup>/rLuc<sup>+</sup>/AphVIII<sup>-</sup>) von 17 und für *cw15Arg<sup>-</sup>A*-2loxAC-APH neun (Ble<sup>+</sup>/rLuc<sup>+</sup>/AphVIII<sup>-</sup>) von zwölf untersuchten Transformanten.

Alle Transformanten mit dem gewünschten Phänotyp - zeozinresistent, luciferaseaktiv und paromomyzinsensitiv - wurden mit einer genomischen PCR auf die vollständige Integration des genetischen Konstruktes untersucht. Da die gesamte Expressionskassette mit 3699bp

(*SacI/KpnI*, siehe Abb. 3.1-g Teil A) sehr groß und GC-reich war, wurden kürzere PCR-Reaktionen durchgeführt (siehe Teil B). PCR1 erstreckte sich vom 5'-Ende des *RBCS2*-Promotor bis zum Stop-Codon des *ble*-Gens (Oligonukleotide: PSPfw und ble(PstI)rev, 816bp) und PCR2 vom 3'-Bereich des *crLuc*-Gens bis zum Anfang des *aphVIII*-Gens (Oligonukleotide: R11f14 und aph2, 870bp). Da die PCR2 nur mit sehr geringer Effizienz durchgeführt werden konnte, musste mit einer sogenannten „nested PCR“ der dazwischen liegende Bereich (PCR3: HSV1 und aph1, 660bp) verifiziert werden. Der gesamte kodierende Bereich des *aphVIII*-Gens wurde mit einer vierten PCR (aphfw/aphrev, 821bp) untersucht. Die Ergebnisse der PCR-Reaktionen sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

<i>lox</i> -Transformanten	PCR1:816bp	PCR2:870bp	PCR3:660bp	PCR4:821bp
<i>cw15Arg<sup>+</sup>A</i> -	PSPfw/blePstIrev	R11f14/aph2	HSV1/aph1	aphfw/aphrev
<b>2loxP-APH</b>	10/10	3/10	3/10	1/10
<b>2loxGA-APH</b>	10/11	6/11	8/11	1/11
<b>2loxAC-APH</b>	9/9	1/9	5/9	2/9

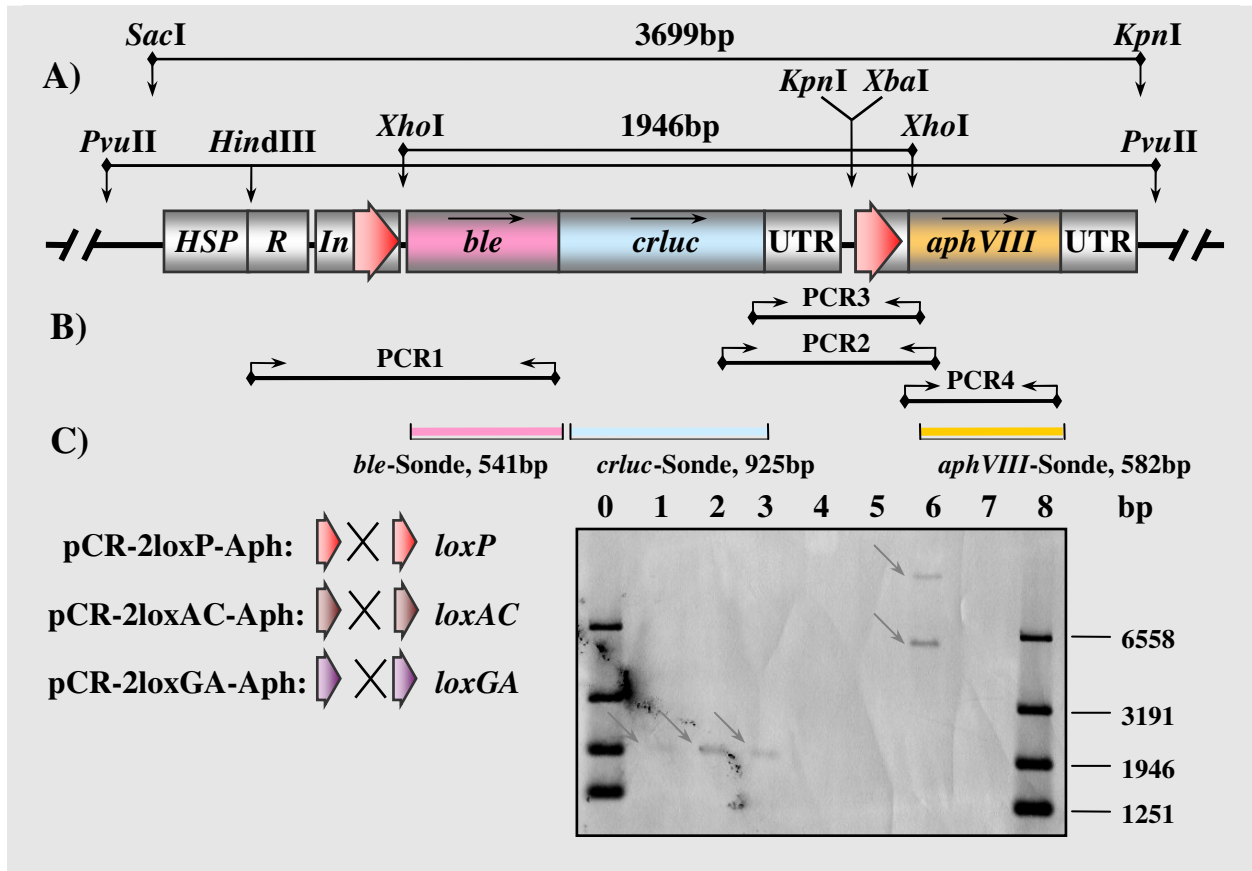
**Tab. 3.1-b Untersuchung des Genotyps der *lox*-Transformanten.** Mit Hilfe der PCR-Reaktion konnte für den Stamm *cw15Arg<sup>+</sup>A*-2loxP-APH für eine von zehn untersuchten Transformanten für alle drei Bereiche der Expressionskassette ein positives Ergebnis erzielt werden, für *cw15Arg<sup>+</sup>A*-2loxGA-APH für eine von elf und für *cw15Arg<sup>+</sup>A*-2loxAC-APH ebenfalls für eine von neun untersuchten Transformanten.

Für jeweils nur eine der untersuchten *lox*-Transformanten (*loxP*, *loxGA* bzw. *loxAC*) konnte für alle drei Bereiche der Expressionskassette ein positives PCR-Ergebnis erzielt werden (nicht dargestellt).

Zur Kontrolle auf die korrekte Expression von Ble-rLuc als Fusionsprotein wurden je 2ml der Algenkultur dieser Transformanten immunologisch mit einem Western Blot untersucht. Es konnte sowohl mit einem polyklonalen anti-Ble-Antikörper als auch mit dem anti-*Renilla*-Luciferase-Antikörper die erwartete Bande bei ~52kDa detektiert werden (nicht dargestellt).

Für die Ermittlung der Kopienzahl der Expressionskassette der *lox*-Transformanten und zur Bestätigung der PCR-Ergebnisse wurde die genomische DNA isoliert und durch Southern Blotting untersucht. Die DNA wurde über Nacht separat mit den Enzymen *XhoI* und *XbaI* verdaut und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Der Transfer auf eine Hybond-N<sup>+</sup> Nylonmembran erfolgte nach dem Protokoll der Firma Roche wie unter 6.3.3.12 beschrieben. Die anschließende Detektion der genomischen DNA wurde mit einer Digoxigenin-markierten Luciferase-Sonde (925bp großes PCR-Produkt, siehe Abb. 3.1-g Teil C) durchgeführt. Für alle drei positiven *lox*-Transformanten konnte das erwartete 1946bp große *XhoI/XhoI*-Fragment nachgewiesen werden (siehe Teil C beim Southern Blot Spur 1, 2 und 3, Banden

sind mit Pfeilen markiert), was das Vorhandensein des *ble-crluc*-Fusionsgens, der 3'-UTR und der zweiten *lox*-Sequenz mit dem 3'-Bereich des Intron1 bis zum Start-ATG des *aphVIII*-Gens bestätigt.



**Abb. 3.1-g Analyse der *lox*-Transformanten.** A) Restriktionsschnittstellen und B) genomische PCR über Teilbereiche der Expressionskassette. C) PCR-Produkte für *ble*-, *crluc* und *aphVIII*-Sonde sowie Restriktionsverdau der genomischen DNA aus den *lox*-Transformanten und deren Detektion mit einer *crluc*-Sonde: Spur 0) und 8) DIG-gelabelter DNA-Molekulargewichtsstandard: Restriktionsverdau des Plasmids pCR-2loxP-APH (*HindIII* = 6558bp, *PvuI* = 3191bp, *XhoI* = 1946bp, *PstI* = 1251bp), 1) *cw15Arg<sup>-</sup>A*-2loxP-APH/*XhoI*, 2) *cw15Arg<sup>-</sup>A*-2loxGA-APH/*XhoI* 3) *cw15Arg<sup>-</sup>A*-2loxAC-APH/*XhoI*, 4) *cw15Arg<sup>-</sup>A*, 5) *cw15Arg<sup>-</sup>A*-2loxP-APH/*XbaI*, 6) *cw15Arg<sup>-</sup>A*-2loxGA-APH/*XbaI* und 7) *cw15Arg<sup>-</sup>A*-2loxAC-APH/*XbaI*.

Da die *XbaI*-Schnittstelle nur einmal in der Expressionskassette zwischen dem *ble-crluc*- und dem *aphVIII*-Gen vorhanden ist, wurde dieser Verdau zur Bestimmung der Kopienzahl im Genom verwendet. Für *cw15Arg<sup>-</sup>A*-2loxGA-APH konnten zwei Kopien bei ~6000bp und >10000bp mit der *crluc*-Sonde nachgewiesen werden (Abb. 3.1-g Teil C) Spur 6), siehe Pfeile). Beide Banden konnten bei >10000bp und >12000bp in einem zweiten parallelen Blot mit einer *aphVIII*-Sonde bestätigt werden (nicht dargestellt). Da die *XbaI*-Schnittstelle in der Expressionskassette selbst lokalisiert ist und diese teilt, weisen die beiden Banden in Abhängigkeit von der verwendeten Sonde unterschiedliche Molekulargewichte auf. Für *cw15Arg<sup>-</sup>A*-2loxP-APH und für -2loxAC-APH konnten keine Banden beim *XbaI*-Verdau detektiert werden, weder mit einer *crluc*-Sonde noch mit einer *aphVIII*-Sonde. Möglicherweise lag keine weitere Schnittstelle in nächster Nähe zum Integrationsort im



Genom vor, so dass die DNA-Fragmente für den effizienten Transfer vom Gel auf die Membran zu groß waren. Da die Ergebnisse der genomischen PCR über den *aphVIII*-Bereich jedoch positiv waren (PCR4, siehe Abb. 3.1-g), wurden trotzdem alle drei *lox*-Transformanten weiter für den Rekombinationsassay in *C. reinhardtii* verwendet.

### Überprüfung der *lox*-Vektoren in dem Stamm *cw15*<sup>+</sup>

Aufgrund der geringen Anzahl geeigneter *lox*-Transformanten ausgehend vom Stamm *cw15Arg<sup>-</sup>A* wurde zum Ende der Arbeit alternativ der argininprototrophe *cw15*<sup>+</sup>-Stamm verwendet, welcher mit dem *ble*-Gen als Selektionsmarker erfahrungsgemäß gute Transformationsraten erzielt (persönliche Mitteilung Dr. Peter Berthold). Algen des Stammes *cw15*<sup>+</sup> wurden mit den Vektoren pCR-2loxP-APH, pCR-2loxGA-APH und pCR-2loxAC-APH transformiert und unter Selektionsdruck auf Zeozin (5µg/ml) kultiviert. Als Transformationskontrolle diente wieder der Vektor pXX37 mit der *ble-crluc*-Expressionskassette. Die entstandenen 124 *ble*<sup>+</sup>-pXX37 Transformanten wurden nicht analysiert. Alle zeozinresistenten *lox*-Transformanten wurden in Flüssigkultur und dem entsprechenden Antibiotikum angeimpft. Nach zwei Tagen erfolgte wiederum die Auswertung hinsichtlich der Expression der Reportergene, siehe Tab. 3.1-c.

<i>lox</i> -Transformanten <i>cw15</i> <sup>+</sup> -	Zeozin - resistenz [5µg/ml]	Luciferase- aktivität	Paromomyzin- sensitivität [20µg/ml]	Phänotyp: Ble <sup>+</sup> -rLuc <sup>+</sup> / AphVIII <sup>-</sup>
<b>2loxP-APH</b>	43/48	43/48	36/48	36/48
<b>2loxGA-APH</b>	15/16	15/16	14/16	14/16
<b>2loxAC-APH</b>	11/16	11/16	13/16	11/16

**Tab. 3.1-c Überprüfung von *lox*-Transformanten in *cw15*<sup>+</sup>.** Für den Stamm *cw15*<sup>+</sup>-2loxP-APH konnten 36 von 48 untersuchten Transformanten mit dem gesuchten Phänotyp zeozinresistent (Ble<sup>+</sup>), luciferaseaktiv (rLuc<sup>+</sup>) und paromomyzinsensitiv (AphVIII<sup>-</sup>) identifiziert werden, für *cw15*<sup>+</sup>-2loxGA-APH 14 (Ble<sup>+</sup>/rLuc<sup>+</sup>/AphVIII<sup>-</sup>) von 16 und für *cw15*<sup>+</sup>-2loxAC-APH elf (Ble<sup>+</sup>/rLuc<sup>+</sup>/AphVIII<sup>-</sup>) von 16 untersuchten Transformanten.

Wie erwartet ergaben sich sowohl mehr Transformanten pro eingesetzte DNA-Menge, als auch eine größere Anzahl mit dem gewünschten Phänotyp. Da die genomische PCR aufgrund der Insertgröße von 3699bp (siehe Abb. 3.1-g) wieder nur über Teilbereiche des Fragmentes durchgeführt werden kann, wurden zeozinpositive, luciferaseaktive und paromomyzinsensitive Transformanten direkt auf die vollständige und möglichst einmalige Integration der Expressionskassette hin untersucht. Die genomische DNA wurde isoliert und diesmal mit *PvuII* über Nacht verdaut. Das Enzym schneidet vor dem HSP-R-In-Promotor

und hinter der 3'-UTR des *aphVIII*-Gens und isoliert damit die gesamte Expressionskassette (4035bp) aus der genomischen DNA. *PvuII* neigt jedoch unter bestimmten Bedingungen zur so genannten Star-Aktivität, in diesem Fall entstehen Banden falscher Größe. Da aber keine weiteren Enzyme zur Überprüfung der gesamten Kassette zur Verfügung standen, wurde *PvuII* mit besonderer Sorgfalt verwendet. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

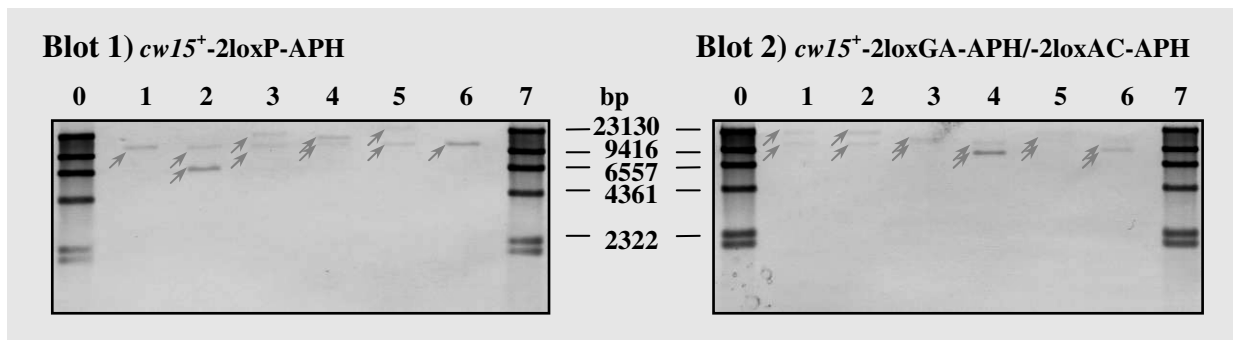
**Signal mit *aphVIII*-Sonde für *PvuII*-Verdau (soll:4045bp)**

<b>2loxP-APH</b>	Von 22 untersuchten Transformanten ergaben sieben eine kleinere Bande (~2000-3000bp), vier eine größere (~4500-9000bp) und sechs lagen ungefähr in dem erwarteten Größenbereich (~4000-4300bp). Für die verbleibenden fünf Algenklone konnte keine Bande detektiert werden.
<b>2loxGA-APH</b>	Von 12 untersuchten Transformanten ergab einer eine kleinere Bande (~1000-3500bp), zwei eine größere (~5500-6500bp) und fünf lagen ungefähr in dem erwarteten Größenbereich (~4000-4300bp). Für weitere vier Algenklone konnte keine Bande detektiert werden.
<b>2loxAC-APH</b>	Von diesen sieben untersuchten Transformanten ergaben zwei eine kleinere Bande (~2000bp), einer eine größere (~5500-6500bp), und einer lag ungefähr in dem erwarteten Größenbereich (~4000-4300bp). Für die verbleibenden drei Algenklone konnte keine Bande detektiert werden.

**Tab. 3.1-d Southern Blot-Analyse von *lox*-Transformanten** im Stamm *cw15<sup>+</sup>* mit einer *aphVIII*-Sonde.

Der Southern Blot (nicht gezeigt) ergab für die *lox*-Transformanten (*loxP*, *loxGA*, *loxAC*) eine starke Varianz für die erwartete Größe der *lox*-Expressionskassette, was auf eine überwiegend unvollständige Integration des Vektors schließen ließ. Für die Linie *cw15<sup>+</sup>*-2loxP-APH konnten sechs von 22 Transformanten, für -2loxGA-APH fünf von zwölf und für -2loxAC-APH einer von sieben Transformanten detektiert werden, welche vermutlich die gesamte *lox*-Expressionskassette in das Genom integriert hatten. Da aber die Wahrscheinlichkeit für Mehrfachinsertionen relativ hoch ist, wurden diese *lox*-Transformanten in weiteren Southern Blot-Analysen untersucht. Die Ermittlung der Kopienzahl erfolgte diesmal mit Hilfe eines *HindIII*-Verdaus. Für die Detektion der *lox*-Expressionskassette wurde neben der *aphVIII*- und der *crluc*-Sonde noch eine zusätzlich *ble*-Sonde (541bp, siehe Abb. 3.1-g Teil C) verwendet. Auf diese Weise konnte für zwei der *cw15<sup>+</sup>*-2loxP-APH-Transformanten eine

einfache und vollständige Integration der Expressionskassette nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.1-h Southern Blot 1): Spur 1 und 6 mit Klon Nr. 6 und 36, Bande bei > 10000bp mit Pfeil markiert). Da aus dem *Hind*III-Verdau der genomischen DNA für beide Transformanten ähnlich große Fragmente entstanden waren, könnten die Klone möglicherweise durch vegetative Zellteilung aus einem Ausgangsklon resultieren. Bei den verbleibenden zehn *cw15<sup>+</sup>-2loxP-APH*-, *-2loxGA-APH*- und *-2loxAC-APH*-Transformanten wurden mit der *ble*-Sonde Doppelinsertionen festgestellt (dargestellt als Pfeile, siehe Blot 1 und 2 in Abb. 3.1-h).

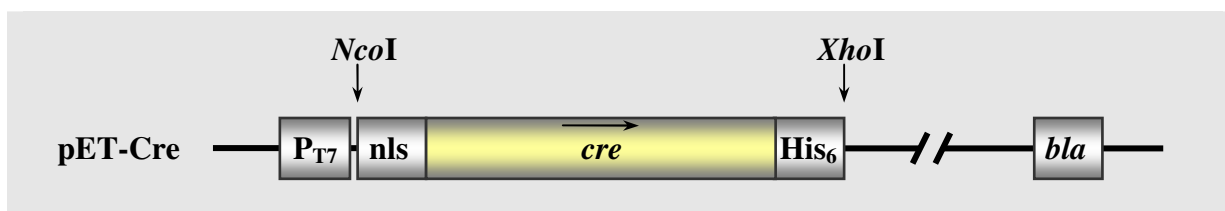


**Abb. 3.1-h Southern Blot-Analyse der *lox*-Transformanten mit einer *ble*-Sonde.** Restriktionsverdau der genomischen DNA aus den *lox*-Transformanten mit *Hind*III. Blot 1): Spur 0) und 7) DIG-gelabelter DNA-Molekulargewichtsstandard, 1)-6) *cw15<sup>+</sup>-2loxP-APH* Transformanten Nr. 6, 18, 21, 26, 32 und 36. Blot 2): Spur 0) und 7) DIG-gelabelter DNA-Molekulargewichtsstandard, 1)-5) *cw15<sup>+</sup>-2loxGA-APH* Transformanten Nr. 5, 6, 8, 12 und 14, 6) *cw15<sup>+</sup>-2loxAC-APH* Transformanten Nr. 15. Da die Banden für die elektronische Dokumentation z.T. sehr schwach waren, wurde der Molekulargewichtsbereich der jeweiligen Bande mit einem Pfeil markiert.

Mit der *crluc*- und der *aphVIII*-Sonde konnte allerdings jeweils nur eine der beiden Banden detektiert werden (nicht gezeigt), was neben der *lox*-Expressionskassette auf eine weitere unvollständige Integration des *ble*-Gens allein hindeutet. Aufgrund der Mehrfachinsertionen wurde keiner der zehn Transformanten weiter untersucht. Sowohl für die *loxGA*- als auch für die *loxAC*-Expressionskassette konnte bis zum Ende der Arbeit kein geeigneter Rezipient im *cw15<sup>+</sup>*-Stamm erzeugt werden, der eine eindeutige Analyse bezüglich einer erfolgreichen Rekombination zulässt. Die beiden Transformanten *cw15<sup>+</sup>-2loxP-APH* Nr. 6 und 36 sollten dagegen als *lox*-Rezipienten zur Überprüfung der Cre-Rekombinaseaktivität in *C. reinhardtii* verwendet werden können.

### 3.2 Expression der Cre-Rekombinase in *E. coli*

Da für eine Vielzahl von Anwendungen, welche in diesem Kapitel noch ausführlicher diskutiert werden, ein hoher Bedarf für die Cre-Rekombinase bestand, wurde das Protein heterolog in *E. coli* exprimiert. Die *cre*-Sequenz aus dem Bakteriophagen P1 (Genbank: X03453) wurde für die spätere Aufreinigung am C-Terminus mit einem His<sub>6</sub>-Tag versehen. An den N-Terminus wurde die Kernlokalisierungssequenz (nls) PKKKRKV des großen SV40 T-Antigens angefügt (75), um die Transportrate des 38kDa großen Proteins durch die Kernmembran in den Zellkern von *C. reinhardtii* zu erhöhen. Verlängerungen am C-Terminus als auch am N-Terminus beeinflussen die Cre-Rekombinase nicht in ihrer Aktivität (83, 147). Der resultierende Vektor pET-Cre (Abb. 3.2-a) war das Ausgangskonstrukt für die folgenden Versuche.

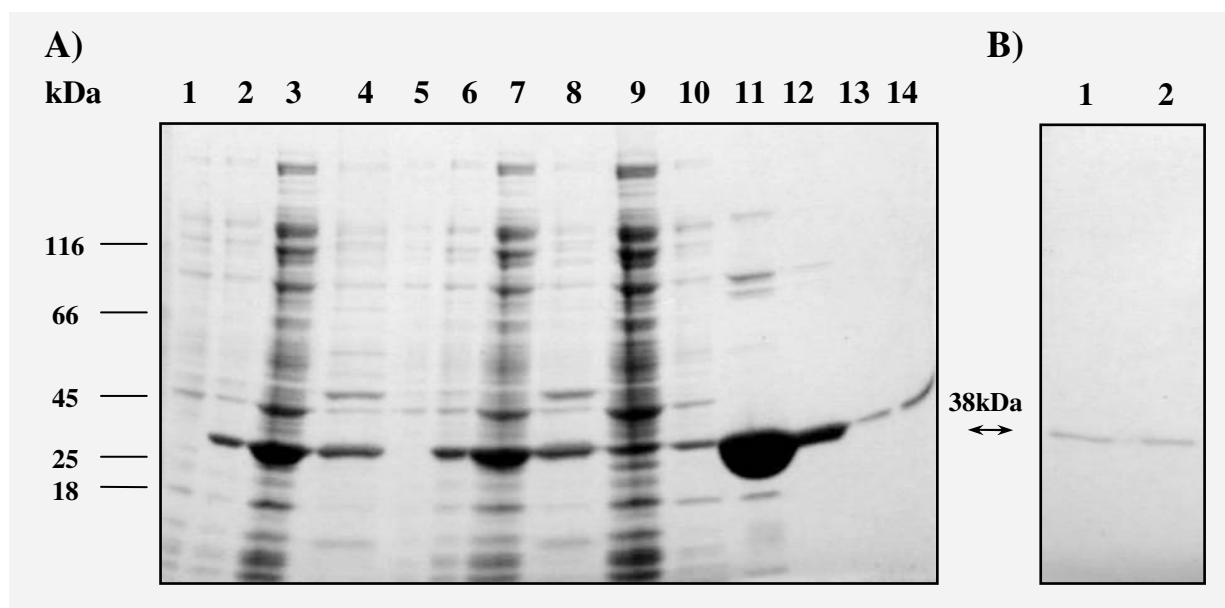


**Abb. 3.2-a Expressionsvektor pET-Cre für *E. coli*.** His<sub>6</sub> = Hexahistidin-Tag, *cre* = Gen für Cre-Rekombinase, nls = Kernlokalisierungssequenz, P<sub>T7</sub> = Promotor für T7-RNA-Polymerase und *bla* = Ampicillinresistenzgen.

#### 3.2.1 Heterologe Expression und Reinigung

Für die Expression der Cre-Rekombinase wurde der Vektor pET-Cre in den Expressionsstamm *E. coli* ER2566 transformiert. Die Expression des Cre-Proteins erfolgte unter der Kontrolle des viralen T7-Promotors. Die kodierende Sequenz für die T7-RNA-Polymerase liegt dabei als Kopie in der chromosomalen DNA des ER2566-Stammes vor. Die Regulierung der Genexpression des *cre*-Gens als auch des *T7*-Gens erfolgte durch einen *lac*-Operator, so dass nach der Zugabe von IPTG die Transkription induziert werden konnte (114, 161). Die Inkubation einer Expressionskultur (zweimal 100ml) erfolgte bei 37°C im Schüttelinkubator bis zu einer OD<sub>578</sub>~0,5. Die Expression wurde mit 0,3mM IPTG induziert. Zur Gewährleistung einer möglichst langsamen Expression erfolgte die weitere Inkubation der Kultur bei 18°C über Nacht. Nach der Ernte der Kultur wurden die Zellen durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff, Wiederauftauen und anschließender Lysozymbehandlung lysiert. Um die Viskosität des Lysats zu verringern, wurde ein DNaseI-Verdau durchgeführt und die DNA anschließend mit einer Ultraschallbehandlung geschert. Zur Trennung des löslichen Proteinanteils vom unlöslichen „inclusion body“ wurde das Lysat scharf abzentrifugiert. Alle Schritte wurden bei 4°C durchgeführt, um eine Degradierung der

Proteine zu minimieren. Die Aufreinigung der His<sub>6</sub>-markierten Cre-Rekombinase aus dem vereinigten löslichen Proteinanteil geschah unter nativen Bedingungen an Ni-NTA-Agarose nach dem modifizierten Protokoll von Qiagen (125). Da die Löslichkeit der Cre unterhalb einer Salzkonzentration von 300mM NaCl sehr gering ist (177), wurde die Ni-NTA-Affinitätschromatographie in Gegenwart von 700mM NaCl im Lysepuffer, Waschpuffer und Elutionspuffer durchgeführt. Das Bettvolumen der Säule betrug dabei 1ml. Der genaue Verlauf der Proteinaufreinigung ist unter 6.4.1.3 beschrieben. Zur Überprüfung der Expression wurden Aliquots der nichtinduzierten, induzierten Expressionskultur, der Waschfraktion und der Elutionsfraktionen durch SDS-PAGE untersucht. Das 10%ige Polyacrylamidgel wurde zur Anfärbung der Proteine mit Coomassie-Färbelösung behandelt. In Abb. 3.2-b kann man deutlich die Expression der Cre-Rekombinase nach erfolgter Induktion mit IPTG erkennen. Das Protein wurde in der korrekten Größe von 38kDa in *E. coli* synthetisiert.



**Abb. 3.2-b SDS-PAGE der His<sub>6</sub>-markierten Cre-Rekombinase** aus *E. coli* in einem 10%igen Polyacrylamidgel und Detektion der Proteine mit Coomassie-Färbung. A) Dokumentation der Expression und Reinigung: Spur 1) nichtinduzierte Probe (Kultur 1 = K1), 2) IPTG-induzierte Probe (K1), 3) löslicher Proteinanteil (K1), 4) „inclusion body“ (K1), 5) nichtinduzierte Probe (Kultur 2 = K2), 6) IPTG-induzierte Probe (K2), 7) löslicher Proteinanteil (K2), 8) „inclusion body“ (K2), 9) Durchlauf der Affinitätsreinigung, 10) Waschfraktion (20mM Imidazol), 11) 1. Elutionsfraktion (250mM Imidazol), 12) 2. Elutionsfraktion, 13) 3. Elutionsfraktion, 14) 4. Elutionsfraktion. B) Dialyse der gereinigten Cre (Elutionsfraktion E4): Spur 1) Überstand und 2) Pellet (20-fach konzentriert).

Des Weiteren konnte mit Hilfe der Ni-NTA-Affinitätschromatographie eine Reinigung und Aufkonzentrierung der His<sub>6</sub>-markierten Cre-Rekombinase erzielt werden (siehe Abb. 3.2-b). Bei den zusätzlichen Banden in Spur 11-14 der Elutionsfraktionen handelt es sich um Verunreinigungen, welche unter Umständen ebenfalls auf der Ni-NTA-Matrix zurückgehalten und unter der Elution mit 250mM Imidazol neben der Cre von der Säule gewaschen wurden.

Aus insgesamt 200ml Expressionskultur konnten ca. 6mg gereinigtes Cre-Protein gewonnen werden. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Elutionsfraktionen E1-E3 in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die vierte Elutionsfraktion (E4) wurde 16h bei 4°C zum Entsalzen gegen PBS-Puffer (50mM Na-Phosphatpuffer, 200mM NaCl pH= 8,0) dialysiert, da die hohe Salzkonzentration in der Elutionsfraktion für die folgenden Anwendungen der Cre-Rekombinase störend war. Infolge der sinkenden NaCl-Konzentration ist ein Teil der Cre beim Pufferwechsel präzipitiert und wurde abzentrifugiert (15min, 4°C und 12000rpm, siehe Abb. 3.2-b Teil B). Das Dialysat wurde mittels Ultrafiltration im Centricon D10 (beschrieben unter 6.4.1.5) auf 1/10 des eingesetzten Volumens aufkonzentriert.

### 3.2.2 Aktivitätstest der aufgereinigten Cre-Rekombinase

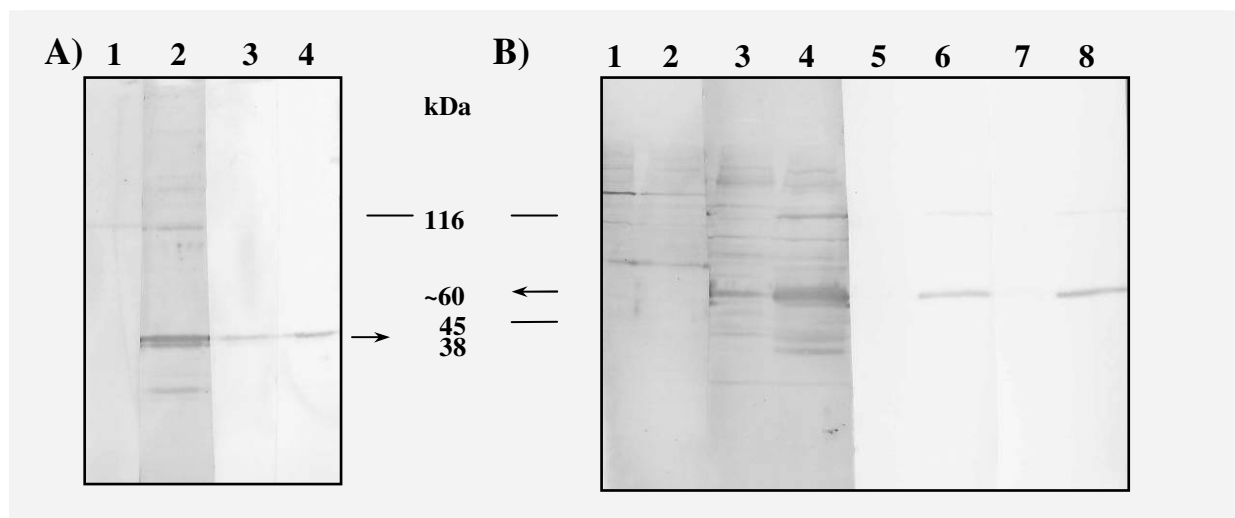
Die gereinigte Cre-Rekombinase (aufkonzentriertes E4-Dialysat) wurde mit einem Aktivitätstest überprüft (Prinzip siehe 6.3.3.8.1). Durch die Fusion zweier *loxP*-tragender Plasmide, pPICZ-E und pUni-solo, konnten kanamyzinresistente *E. coli* DH5 $\alpha$ -Transformanten selektiert werden (nicht gezeigt). Diese *in vitro* Rekombinaseaktivität wurde durch den bereits beschriebenen *in vivo* Rekombinationsassay, siehe 3.1.2 bestätigt. Die in *E. coli* exprimierte Cre-Rekombinase konnte somit genauso wie die kommerziell erhältliche Cre-Rekombinase in den folgenden Rekombinationsassays für *C. reinhardtii* verwendet werden.

### 3.2.3 Verwendung der gereinigten Cre-Rekombinase aus *E. coli*

#### 3.2.3.1 Herstellung eines polyklonalen anti-Cre-Antikörpers

Die immunologische Detektion der Cre-Expression erfolgte zu Beginn der Arbeit mit dem polyklonalen anti-Cre-Antikörper der Firma Novagen. Aufgrund von starken Kreuzreaktionen mit *C. reinhardtii* spezifischen Proteinen (nicht gezeigt), wurde durch die Firma Pineda-Antikörper-Service ein eigener polyklonaler anti-Cre-Antikörper hergestellt. Dafür wurde die erste Elutionsfraktion der Cre-Reinigung (siehe 3.2.1) gegen PBS-Puffer (50mM Na-Phosphatpuffer, 200mM NaCl pH=8,0) dialysiert und anschließend das Präzipitat abzentrifugiert (wie für die E4-Fraktion bereits beschrieben). Vom Überstand wurden 200 $\mu$ g Cre-Rekombinase als Antigen eingeschickt. Die Immunisierung wurde von der Firma Pineda in Kaninchen durchgeführt. Zuvor wurden die Präimmunseren verschiedener Versuchstiere auf Kreuzreaktionen mit dem Zellextrakt aus *C. reinhardtii* als auch mit dem Antigen Cre überprüft und zwei geeignete Tiere ausgewählt (nicht gezeigt). Nach einer Immunisierung von 120 Tagen wurden beide Tiere ausgeblutet. Das Immunserum vom 120. Tag von Tier 2

wurde mittels Affinitätsreinigung von möglichen kreuzreagierenden Antikörpern befreit (siehe unter 6.4.3.1.3). In Abb. 3.2-c Teil A) ist die immunologische Detektion der Cre aus der E1-Fraktion der Reinigung zu sehen. Es ist deutlich zu erkennen, dass bei der Verwendung des rohen Immunserums vom 120. Tag im Vergleich zum ersten und zweiten Eluat der Antikörperreinigung die Detektion, aber auch der Hintergrund wesentlich stärker sind. Auch bei der Untersuchung von Proteinextrakten des *C. reinhardtii* Stammes *cw15<sup>+</sup>* und der Transformante *cw15<sup>+</sup>*-BleCre Nr. 2 (Abb. 3.2-c Teil B) konnte durch die Affinitätsreinigung eine deutliche Erhöhung der Spezifität des Antikörpers im 1. und 2. Eluat im Vergleich zum unaufgereinigten Immunserum erreicht werden. Alle weiteren Versuche wurden mit dem 2. Eluat des gereinigten Antikörperserums durchgeführt.

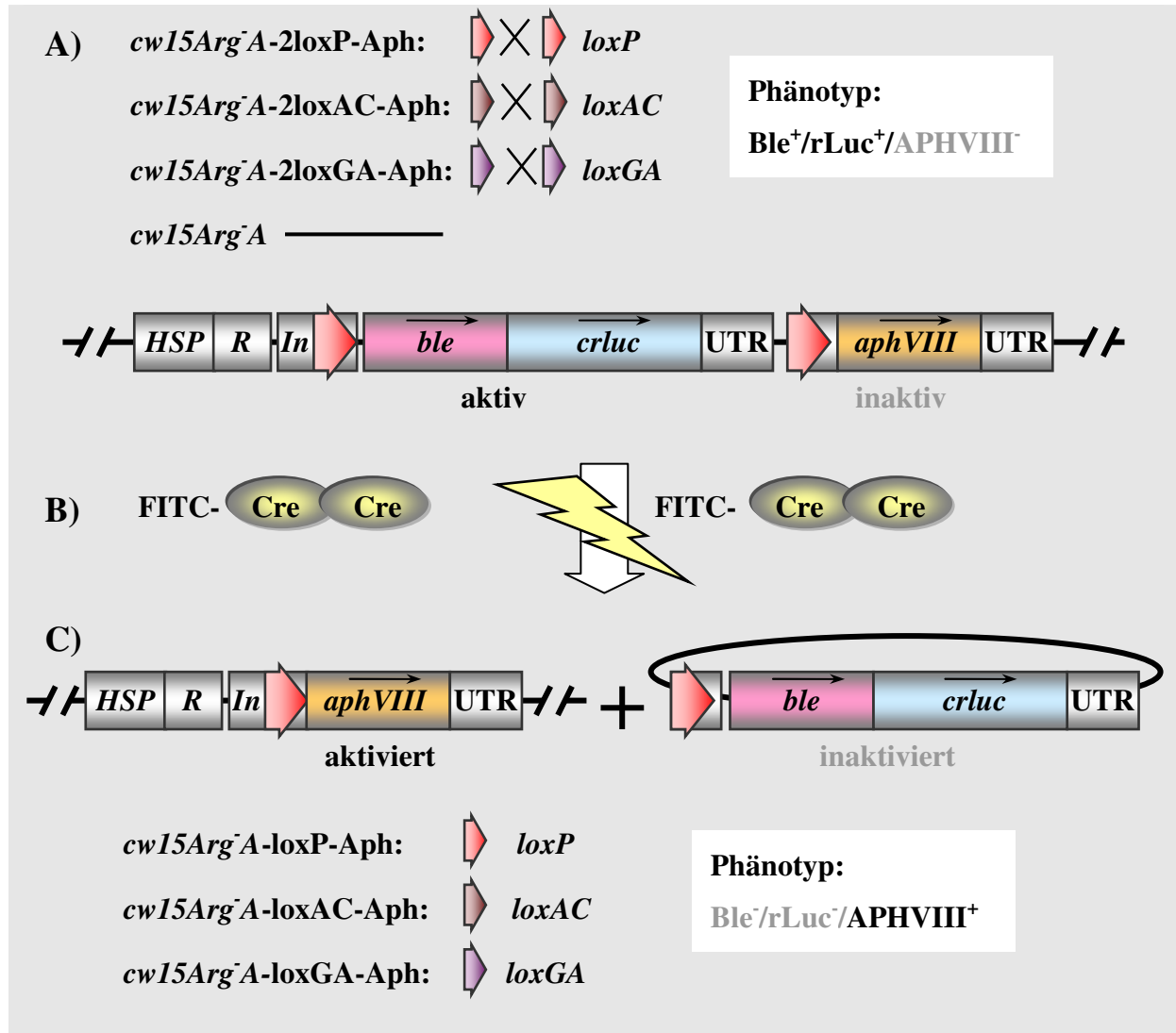


**Abb. 3.2-c Affinitätsreinigung des Antiserums aus Kaninchen (Tier 2).** A) Überprüfung der Cre-Fraktion E1 aus *E. coli* mit Spur 1) Präimmunserum, 2) Antiserum 120.Tag, 3) 1. Eluat der Antikörperreinigung und 4) 2. Eluat der Antikörperreinigung. B) Überprüfung möglicher Kreuzreaktionen des Wildtyps *cw15<sup>+</sup>* und einer *cw15<sup>+</sup>*-BleCre-Transformante (Nr. 2) im direkten Vergleich: Spur 1) und 2) Präimmunserum, 3) und 4) Antiserum 120. Tag, 5) und 6) 1. Eluat der Antikörperreinigung und 7) und 8) 2. Eluat der Antikörperreinigung.

### 3.2.3.2 Elektroporation von *C. reinhardtii* mit einer FITC-markierten Cre

Um die Aktivität der aufgereinigten Cre-Rekombinase in *C. reinhardtii* zu untersuchen, wurde der bereits erwähnte Rekombinationsassay verwendet, welcher ein einfaches Screenen der entstandenen Transformanten auf eine erfolgreiche Rekombination zulässt (siehe Abb. 3.2-d). Als Ausgangsstämme dienten *cw15Arg<sup>-</sup>A*-2loxP-APH, -2loxGA-APH und -2loxAC-APH (*lox*-Transformanten aus 3.1.3), als Negativkontrolle der untransformierte Stamm *cw15Arg<sup>-</sup>A*. Die verwendeten *lox*-Transformanten waren zeozinresistent, luciferaseaktiv und paromomyzinsensitiv. Der Kontrollstamm enthielt dagegen weder die Gene *ble*, *crluc* noch *aphVIII*. Die aus *E. coli* gereinigte Cre-Rekombinase wurde mit dem FluoReporter® FITC Labeling Kit der Firma Molecular Probes mit einem Fluoreszenzfarbstoff (FITC = Fluoresceinisothiocyanat) markiert. Die Fluoreszenzmarkierung der Cre-Rekombinase

ermöglichte die Untersuchung der Verteilung des Proteins in der Algenzelle mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie. Die Einführung der aufgereinigten Cre-Rekombinase erfolgte mittels Elektroporation (siehe 6.4.1.7). Die elektroporierten Zellen wurden dann unter dem Fluoreszenzmikroskop auf erfolgreichen Transfer des fluoreszierenden Proteins in den Zellkern der Alge untersucht.



**Abb. 3.2-d Rekombinationsassay mit FITC-Cre-Rekombinase in *C. reinhardtii*.** A) *lox*-Transformanten *cw15Arg<sup>-</sup>A-2loxP-APH*, *-2loxGA-APH* und *-2loxAC-APH* mit der entsprechenden *lox-ble-crluc-lox*-Expressionskassette und der untransformierte Stamm *cw15Arg<sup>-</sup>A* als Negativkontrolle. B) Einführung der FITC-markierten Cre-Rekombinase mittels Elektroporation (dargestellt als gelber Pfeil). C) Untersuchung der *lox*-Transformanten auf die erfolgreiche Rekombination anhand ihres Phänotyps.

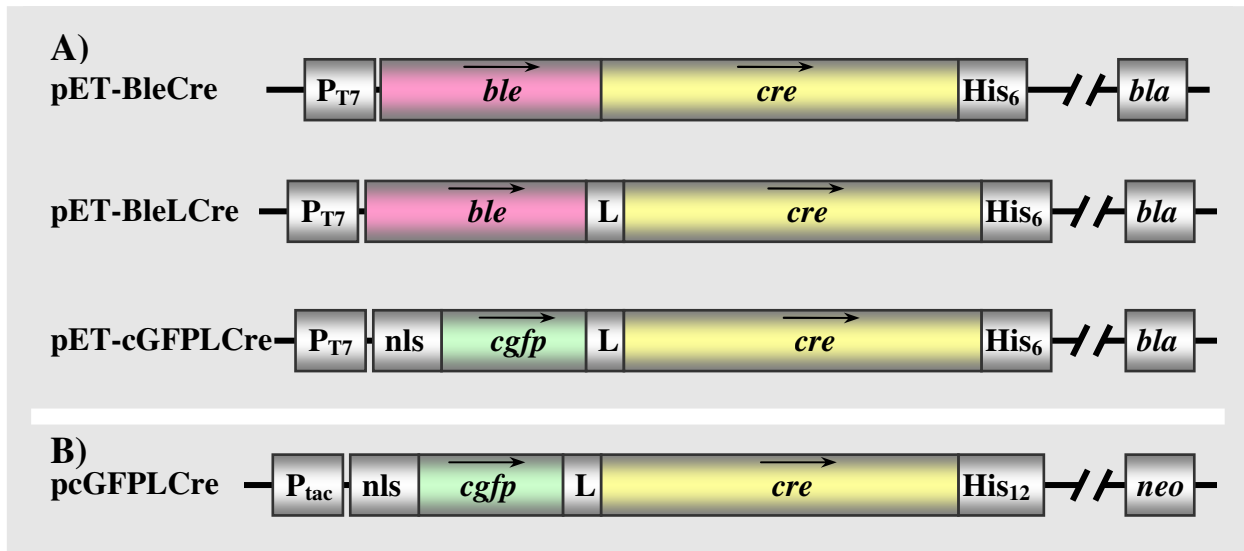
Bei allen vier Stämmen befand sich jedoch die fluoreszierende Cre-Rekombinase nach der Elektroporation überwiegend im Medium, das Protein lag dort aggregiert vor. Es gab nur wenige Zellen, die eine leichte Fluoreszenz am Zellrand aufwiesen, die meisten Zellen waren infolge der Elektroporation abgestorben (nicht gezeigt). Um eine möglicherweise erfolgte Rekombination trotzdem nicht auszuschließen, wurden die Zellen in frisches TAP überimpft und nach 24h auf TAP-Platten mit Paromomycin (20µg/ml) selektiert. Für keinen der Stämme



*cw15Arg<sup>-</sup>A-2loxP-APH*, *-2loxGA-APH* oder *-2loxAC-APH* konnten paromomycinresistente Transformanten erhalten werden. Das Experiment wurde dreimal wiederholt, wobei in keinem der Versuche eine erfolgreiche Aufnahme des aktiven Proteins in den Zellen nachgewiesen werden konnte. Mögliche Ursachen für die fehlende Rekombinaseaktivität der markierten FITC-Cre-Rekombinase können ungeeignete Pufferbedingungen beispielsweise beim Markierungsprozess oder der Lagerung sein. Aus diesem Grund wurde eine andere Strategie zur Visualisierung der rekombinanten Cre-Rekombinase in den Algenzellen gewählt. Die *in vivo* Fluoreszenzmarkierung der Cre-Rekombinase mit GFP stellt eine schnellere und günstigere Möglichkeit im Vergleich zur FITC-Markierung dar (42, 46).

### 3.3 Expression von Cre-Fusionsproteinen in *E. coli*

Vor der eigentlichen Verwendung des GFP-Cre-Fusionsproteins in den Algen wurde dessen Rekombinaseaktivität *in vitro* und *in vivo* in *E. coli* untersucht. Parallel zum GFP-Cre-Protein wurde ein weiteres Fusionsprotein, Ble-Cre, überprüft. Sollte die Einführung des aufgereinigten Cre-Proteins in seiner aktiven Form mittels Elektroporation nicht möglich sein, kann mit Hilfe eines *ble-cre*-Expressionsvektors die Isolierung *cre*-exprimierender Transformanten in *C. reinhardtii* unter Selektionsdruck auf Zeozin erfolgen. Das Ble-Protein fungiert dabei zusätzlich als Kernlokalisierungssignal (14), da das Ble-Cre-Fusionsprotein mit einem Molekulargewicht von 53kDa zu groß für eine passive Diffusion durch die Kernmembran ist (162). Das GFP-Cre-Protein (68kDa) wurde ebenfalls mit einer Kernlokalisierungssequenz (nls des großen SV40 T-Antigens) versehen. Die Verknüpfung der Cre-Rekombinase erfolgte für alle Fusionsproteine über den N-Terminus des Enzyms, die Aktivität der Cre sollte dadurch nicht beeinflusst werden (83). Am C-Terminus befand sich wiederum ein His<sub>6</sub>-Tag, der die spätere Aufreinigung durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie ermöglichte. Alternativ wurde ein Abstandshalter („linker“ mit 14 Aminosäuren, L = GSNNGNASGNNSG) zwischen die beiden Proteine integriert, um mögliche sterische Hinderungen und damit eine verminderte Enzymaktivität zu minimieren. Wie zuvor wurden alle Cre-Fusionsproteine mit dem pET-Vektor-System hergestellt (siehe Abb. 3.3-a Teil A). Das Fusionsprotein GFP-L-Cre wurde zusätzlich in einem veränderten pMAL-p2X-Vektor exprimiert (siehe Abb. 3.3-a Teil B).

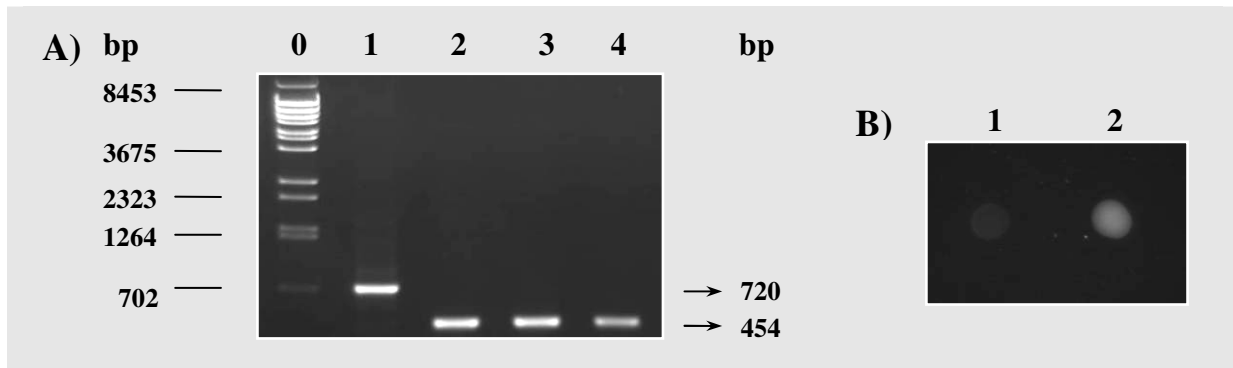


**Abb. 3.3-a Expressionsvektoren für Cre-Fusionsproteine.** A) Alle Gene wurden in den Vektor pET16b (Fa. Novagen) integriert. His<sub>6</sub> = Hexahistidin-Tag, *cre* = Gen für Cre-Rekombinase, *ble* = Zeozinresistenzgen, *cgfp* = codonoptimiertes Gen für das Grün fluoreszierende Protein (GFP), L = „linker“, nls = Kernlokalisierungssequenz, P<sub>T7</sub> = Promotor für T7-RNA-Polymerase und *bla* = Ampicillinresistenzgen. B) pMAL-p2X (Fa. NEB) mit His<sub>12</sub> = Polyhistidin-Tag, P<sub>tac</sub> = Hybridpromotor für *E. coli* eigene RNA Polymerase und *neo* = Kanamycinresistenzgen.

### 3.3.1 *In vivo* Rekombinationsassay für Cre-Fusionsproteine

Der *in vivo* Rekombinationsassay für die Cre-Fusionsproteine wurde in *E. coli* wie unter 3.1.2 beschrieben und mit den Expressionvektoren pET-BleCre, pET-BleLCre und pET-cGFPLCre (siehe Abb. 3.3-a Teil A) sowie dem leeren Kontrollvektor pET16b durchgeführt. Dafür wurde wiederum das pMM354/*Bst*EII/*Pae*I-Fragment (siehe Abb. 3.1-f Teil A) mit dem 266bp großen *loxP*-X-*loxP*-Insert in die *Eco*RI-Schnittstelle des jeweiligen Expressionsvektors integriert und dann in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert. Wie unter 3.1.2 beschrieben, konnte bereits in den DH5 $\alpha$ -Zellen in Abwesenheit der T7-RNA-Polymerase eine schwache Expression des Fremdgens stattfinden. Die Transformanten wurden mittels Kolonie-PCR (Oligonukleotide: PSPfw und aph1) auf die erfolgte Rekombination des *loxP*-X-*loxP*-Inserts untersucht, das erwartete PCR-Produkt von 454bp konnte bei allen *cre*-exprimierenden Vektoren erhalten werden (siehe Abb. 3.3-b Teil A). Es wurde jeweils von einer positiven Transformante die Plasmid-DNA isoliert und mittels Restriktionsverdau analysiert und sequenziert. Die Rekombination des *loxP*-X-*loxP*-Inserts fand in den Expressionvektoren pET-Cre-*loxP*-X-*loxP* sowie pET-BleCre-*loxP*-X-*loxP*, pET-BleLCre-*loxP*-X-*loxP* und pET-cGFPLCre-*loxP*-X-*loxP* erfolgreich statt. Die Rekombinaseaktivität der Fusionsproteine Ble-Cre, Ble-L-Cre und GFP-L-Cre wurde durch die Verlängerung am N-Terminus der Cre, wie erwartet, nicht gestört. Die Aktivität des Ble- und des GFP-Anteils des jeweiligen Fusionsproteins wurde im Expressionsstamm *E. coli* ER2566 überprüft, da die Expressionsrate unter IPTG-Induktion in diesem Stamm wesentlich höher ist. Bakterien,

transformiert mit den Vektoren pET-BleCre-loxP-X-loxP sowie pET-BleLCre-loxP-X-loxP, wurden dazu auf LB<sub>ZXI</sub>-Platten bzw. mit pET-cGFPLCre-loxP-X-loxP transformierte, auf LB<sub>AXI</sub>-Platten selektiert. Zeozinresistente Transformanten konnten sowohl für Ble-Cre als auch für Ble-L-Cre erhalten werden. Die Fluoreszenz des GFP in GFP-L-Cre-exprimierenden ER2566-Transformanten konnte ebenfalls schwach unter dem UV-Licht beobachtet werden (siehe Abb. 3.3-b Teil B) Spur 2). Die Aktivität der beiden Proteinanteile (Ble und GFP) ist durch deren Fusion also nicht beeinträchtigt.



**Abb. 3.3-b *In vivo* Rekombinationsassay für Cre-Fusionsproteine.** A) Kolonie-PCR von *E. coli* mit den jeweiligen Plasmiden: Spur 0) DNA-Molekulargewichtsstandard, 1) pET-loxP-X-loxP, 2) pET-BleCre-loxP, 3) pET-BleLCre-loxP und 4) pET-GFPLCre-loxP. B) Fluoreszenzüberprüfung von Bakterien mit GFP-L-Cre: Spur) 1 Kontrolle: pET-loxP-X-loxP und 2) pET-GFPLCre-loxP.

### 3.3.2 Expression und Reinigung der Cre-Fusionsproteine

Mit Hilfe des *in vivo* Rekombinationsassays konnte die Rekombinaseaktivität der Fusionsproteine Ble-Cre, Ble-L-Cre und GFP-L-Cre nachgewiesen werden. Um die *in vitro* Aktivität der aufgereinigten Cre-Fusionsproteine zu überprüfen, wurden die Expressionsvektoren pET-BleCre, pET-BleLCre und pET-cGFPLCre (Abb. 3.3-a Teil A) in den Expressionsstamm *E. coli* ER2566 transformiert. Die Expression, Zellyse und Aufreinigung der Cre-Fusionsproteine erfolgte genau wie für die Cre-Expression, siehe 3.2.1. Der Verlauf ist schematisch in Abb. 3.3-c dargestellt. Die Fusionsproteine Ble-Cre und Ble-L-Cre konnten erfolgreich in *E. coli* ER2566 exprimiert und mit der Ni-NTA-Affinitätschromatographie angereichert werden (nicht dargestellt). Bei der Dialyse kam es ähnlich wie bei der Cre, jedoch zur Präzipitation von einem Teil des Fusionsproteins.

Bei der Expression von GFP-L-Cre im pET16b-Vektor konnte nur eine geringe Ausbeute erzielt werden. Die SDS-PAGE zeigte, dass sich der Hauptteil des GFP-L-Cre nach der Zellyse im „inclusion body“ befand (nicht gezeigt). Die Analyse unter UV-Licht zeigte ebenfalls nur eine schwache Fluoreszenz des Kulturüberstandes und eine starke Fluoreszenz im unlöslichen Zellpellet. Für die spätere Integration in *C. reinhardtii* wurde das Protein aber unbedingt in seiner aktiven löslichen Form benötigt. Daher wurde alternativ das Plasmid

pcGFPLCre (ein abgewandelter pMAL-p2X-Vektor von Dr. M. Fuhrmann, Abb. 3.3-a Teil B) für die Expression von GFP-L-Cre in *E. coli* DH5 $\alpha$  verwendet. Die Synthese des Proteins erfolgt in diesem Stamm langsamer und die Ausbeute des löslichen Proteinanteils war dadurch höher (SDS-PAGE nicht dargestellt). Die Zelllyse und die Aufreinigung erfolgten wie für pET-cGFPLCre (siehe Abb. 3.3-c). Beim Entsalzen mittels Dialyse ist jedoch, wie zuvor bei den Proteinen Cre, Ble-Cre, Ble-L-Cre, beim Pufferwechsel ein Teil des Proteins ausgefallen.

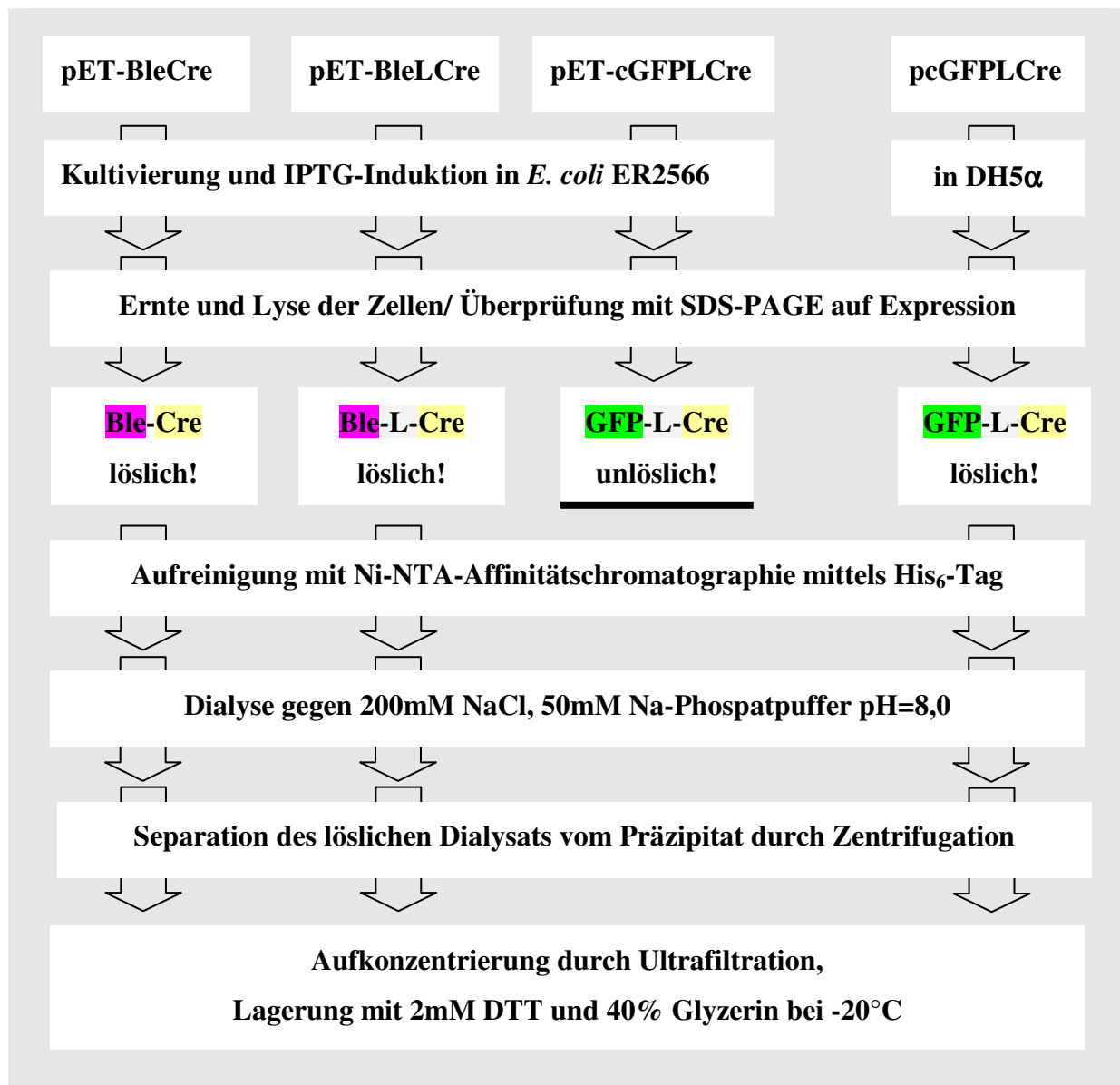


Abb. 3.3-c Schema der Expression und Reinigung der verschiedenen Cre-Fusionsproteine.

### 3.3.3 Aktivitätstest der aufgereinigten Cre-Fusionsproteine

#### In *E. coli*

Die *in vitro* Aktivität der aufgereinigten Fusionsproteine Ble-Cre, Ble-L-Cre und GFP-L-Cre wurde wiederum mit einem *in vitro* Rekombinationsassay überprüft. Als Positivkontrolle diente die kommerziell erhältliche Cre-Rekombinase von NEB. Für keines der Cre-Fusionsproteine konnte jedoch eine Rekombination der *lox*-Plasmide pPICZ-E und pUni-solo nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Dagegen wurden für die kommerzielle Cre-Rekombinase infolge der Fusion beider *lox*-Plasmide kanamycinresistente Transformanten in *E. coli* DH5 $\alpha$ -Zellen selektiert.

Da aber die Aktivität der Cre-Rekombinase der Fusionsproteine Ble-Cre, Ble-L-Cre und GFP-L-Cre mit Hilfe des *in vivo* Rekombinationsassays prinzipiell bestätigt wurde, müssen, wie auch für die FITC-markierte Cre-Rekombinase, andere Ursachen für die fehlende Rekombinaseaktivität verantwortlich sein (z.B. fehlerhafte Lagerung, zu geringe Proteinkonzentration, ungeeignete Rekombinationsbedingungen).

Die aufgereinigten Fusionsproteine Ble-Cre und Ble-L-Cre wurden in späteren Versuchen als Kontrolle im Western Blot für die *ble-cre*-Expression in *C. reinhardtii* verwendet.

#### In *C. reinhardtii*

Trotz des bisher fehlenden Nachweises für die *in vitro* Rekombinaseaktivität für das Fusionsprotein GFP-L-Cre wurde das Protein mit Hilfe der Elektroporation in den *lox*-Stamm *cw15Arg<sup>-</sup>A-2loxGA-APH* integriert (wie bereits für die FITC-markierte Cre-Rekombinase beschrieben, siehe Abb. 3.2-d). Als Negativkontrolle diente der untransformierte Stamm *cw15Arg<sup>-</sup>A*. Ähnlich wie für die FITC-Cre-Rekombinase lag auch das GFP-L-Cre-Protein überwiegend aggregiert im Medium und nicht im Zellkern der Alge vor. Auch nach Transfer der Algen auf TAP-Platten mit Paromomycin konnten für den *lox*-Stamm *cw15Arg<sup>-</sup>A 2loxP-APH* keine paromomycinresistenten Transformanten erhalten werden. Das Experiment wurde dreimal mit demselben Ergebnis wiederholt.

Weder für die FITC-markierte Cre-Rekombinase noch für das GFP-L-Cre-Fusionsprotein konnte mit Hilfe der Elektroporation das Protein in seiner aktiven Form in die Algenzellen eingeschleust werden, in keinem der *lox*-Rezipienten war eine Cre-vermittelte Rekombination nachweisbar.

### 3.4 Expression der Cre (P1) in *C. reinhardtii*

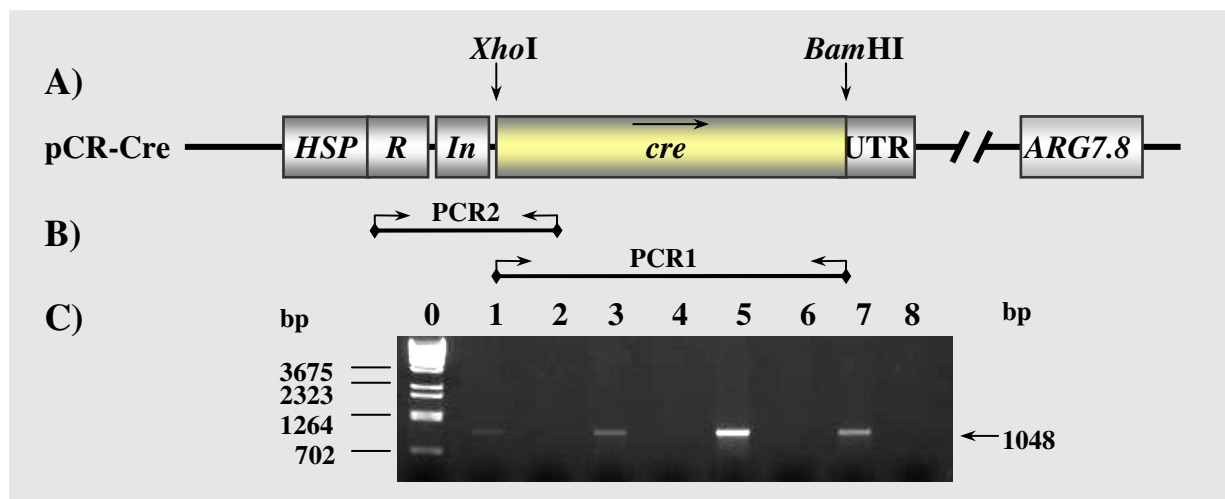
Da eine direkte Einschleusung des aufgereinigten Cre-Proteins mit Hilfe der Elektroporation in die *C. reinhardtii* *lox*-Transformanten bisher zu keiner erfolgreichen Rekombination führte, wurde die kodierende Sequenz der Cre-Rekombinase (Originalsequenz aus dem Bakteriophagen P1) selbst zur Genexpression in das *C. reinhardtii*-Genom eingeführt. Dafür wurde das *cre*-Gen in den Vektor pSI105 unter der Kontrolle des starken konstitutiven HSP-R-In-Promotors integriert (153). Die Selektion erfolgte mit dem Auxotrophiemarker *ARG7.8* (28), welcher sich ebenfalls auf dem pSI105-Plasmid befindet. Der resultierende Vektor pCR-Cre (siehe Abb. 3.4-a Teil A) wurde in den argininauxotrophen Stamm *cw15Arg<sup>-</sup>A-2loxGA-APH* (= *lox*-Transformante siehe 3.1.3) eingeschleust. Dies hatte den Vorteil, dass sowohl die Integration der *cre*-Plasmids (führt zur Argininprototrophie) als auch die Rekombinaseaktivität der exprimierten Cre-Rekombinase (führt zur Paromomycinresistenz) parallel untersucht werden konnten.

#### 3.4.1 Integration des pCR-Cre-Expressionsvektors

Sechs bis acht Tage nach der Transformation mit dem Vektor pCR-Cre wurden 150 argininprototrophe Transformanten auf TAP-Platten ohne Arginin selektiert. Für die weitere Analyse wurden 38 Einzelkolonien in TAP-Flüssigmedium kultiviert. Mit Hilfe der PCR-Reaktion wurde die Integration des *cre*-Gens (Abb. 3.4-a. Teil B) in das *C. reinhardtii*-Genom untersucht, als Negativkontrolle diente der Ausgangstamm *cw15Arg<sup>-</sup>A*. Für 19 von 38 untersuchten argininprototrophen Transformanten konnte mit der ersten PCR (*creXhofw* und *CreBamrev*, dargestellt für sieben von 38 Transformanten in Abb. 3.4-a) und der zweiten PCR (*PSPfw* und *Cre2M*, nicht dargestellt) eine vollständige *cre*-Kassette vom 5'-*RBCS2*-Promotor bis zum Stopcodon des *cre*-Gens im Genom nachgewiesen werden.

<i>lox</i> -Transformanten	PCR1: 1048bp	PCR2: 420bp
<i>cw15Arg<sup>-</sup></i>	<i>creXhofw/crebamrev</i>	<i>PSPfw/Cre2M</i>
<b>2loxGA-APH/Cre</b>	19/38	19/19

**Tab. 3.4-a Untersuchung des Genotyps** der *cw15Arg<sup>-</sup>-2loxGA-APH/Cre*-Transformanten mittels PCR-Reaktionen.



**Abb. 3.4-a** A) Expressionsvektor pCR-Cre für *C. reinhardtii*. B) Genomische PCR zur Analyse des *cre*-Gens, PCR1 über die gesamte *cre*-Sequenz mit den Oligonukleotiden creXhofw und creBamrev (1048bp) und PCR2 vom 5'-*RBCS2*-Promotor bis zum 5'-Ende des *cre*-Gens (PSPfw und CreM2, 420bp). C) Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Reaktionen (Oligonukleotide: creXhofw und creBamrev) für die Transformanten *cw15Arg*<sup>+</sup> 2loxGA-APH/Cre Nr. 1-7: Spur 0) DNA-Molekulargewichtsstandard, Spur 1), 3), 5), 7) positiv auf integriertes *cre*-Gen und Spur 2), 4), 6) negativ auf *cre*-Gen, 8) Negativkontrolle *cw15Arg*<sup>-</sup>A.

Zur weiteren Analyse der Cre-Expression wurden diese 19 argininauxotrophen *cre*<sup>+</sup>-Transformanten immunologisch in einem Western Blot untersucht. Für keine der Transformanten konnte die erwartete Bande der Cre-Rekombinase von 38kDa mit dem Cre-Antikörper (Eigenisolat, Verdünnung 1:1000) detektiert werden (nicht dargestellt). Die Transformation von *cw15Arg*<sup>-</sup>A-2loxGA-APH mit dem Plasmid pCR-Cre wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Trotz vollständiger Integration der *cre*-Expressionskassette konnte jedoch in keiner der untersuchten *cw15Arg*<sup>+</sup>-2loxGA-APH/Cre-Transformanten die Expression der Cre-Rekombinase immunologisch nachgewiesen werden.

### 3.4.2 Überprüfung der Rekombinaseaktivität in *cw15Arg*<sup>+</sup>A-2loxGA-APH/Cre

Da für die Durchführung der ortsgerichteten Rekombination mit zwei identischen *lox*-Sequenzen theoretisch bereits vier aktive Cre-Moleküle genügen, wurden die *cw15Arg*<sup>+</sup>-2loxGA-APH/Cre-Transformanten auf eine mögliche Cre-vermittelte Rekombination untersucht, siehe Tab. 3.4-b.

<i>lox</i> -Transformanten <i>cw15Arg</i> <sup>+</sup> -	Zeozin- sensitivität [5µg/ml]	Luciferase- aktivität	Paromomyzin- resistenz [20µg/ml]	Phänotyp: <i>Ble</i> <sup>-</sup> / <i>rLuc</i> <sup>-</sup> / <i>AphVIII</i> <sup>+</sup>
2loxGA-APH/Cre	0/19	19/19	0/19	0/19

**Tab. 3.4-b** Untersuchung des Phänotypes der *cw15Arg*<sup>+</sup>-2loxGA-APH/Cre-Transformanten.

Keine der 19 analysierten *cw15Arg<sup>+</sup>-2loxGA-APH/Cre*-Transformanten wies den erwarteten Phänotypen - zeozinsensitiv, luciferasenegativ und paromomyzinresistent - nach erfolgter Rekombination durch die Cre-Rekombinase auf. Zusätzlich wurde bei allen Transformanten die *lox*-Expressionskassette auf mögliche Veränderungen, bedingt durch eine Cre-vermittelte Rekombination, mit Hilfe der genomischen PCR untersucht. Die Analyse erfolgte dabei mit den gleichen PCR-Reaktionen wie für den Ausgangsstamm *cw15Arg<sup>+</sup>A-2loxGA-APH* bereits beschrieben (siehe Abb. 3.1-g Teil A). Die Ergebnisse der PCR-Reaktionen sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

<i>lox</i> -Transformanten	PCR1: 816bp	PCR2: 870bp	PCR3: 660bp	PCR4: 821bp
<i>cw15Arg<sup>+</sup>-</i>	PSPfw/blePstIrev	RI1f14/aph2	HSV1/aph1	aphfw/aphrev
2loxGA-APH/Cre	19/19	2/19	19/19	19/19

**Tab. 3.4-c PCR-Reaktionen über charakteristische Bereiche** der *lox*-Expressionskassette in *cw15Arg<sup>+</sup>-loxGA-APH/Cre*-Transformanten.

Die PCR-Reaktionen über den Bereich der *lox*-Expressionskassette bestätigten den Phänotyp - zeozinresistent, luciferaseaktiv und paromomyzinsensitiv - in den *cw15Arg<sup>+</sup>-2loxGA-APH/Cre*-Transformanten. Bei keiner der 19 untersuchten Algenkulturen fand eine Rekombination der *lox*-Erkennungssequenzen statt. Die Expressionskassette mit dem *ble-crluc*-Fusionsgen „downstream“ des HSP-R-In-Promotors sowie dem inaktiven *aphVIII*-Gen entspricht genau der des Ausgangsstammes *cw15Arg<sup>+</sup>A-2loxGA-APH*. Die Integration des *cre*-Gens hat also zu keiner Expression der aktiven Cre-Rekombinase geführt. Infolge einer fehlenden Codonoptimierung und fehlender Introns in der *cre*-Sequenz wurde das Gen möglicherweise nur schwach oder aufgrund von Genstilllegung nicht exprimiert (17).

### 3.5 Expression der codonoptimierten Cre in *C. reinhardtii*

Die kodierende Sequenz für die Cre-Rekombinase aus dem Bakteriophagen P1 weist infolge seines „prokaryontischen“ Ursprunges einen GC-Gehalt von ~48% auf (<http://www.kazusa.or.jp/codon>). Das Genom von *C. reinhardtii* hat aber im Vergleich zum Bakteriophagen P1 einen GC-Anteil von 62%. Die unterschiedliche Codonverwendung der beiden Organismen kann zu einer verminderten Expression des *cre*-Gens führen. Bereits Shimshek et al. haben gezeigt, dass eine Verbesserung der Cre-Expression in HEK293-Zellen durch eine Anpassung an die humane Codonverwendung erreicht werden kann (150). In *C. reinhardtii* konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Anpassung eines fremden Gens an die physiologische Codonzusammensetzung zu einer stabileren Genexpression führt.



Amino Acid	Count
Ala	100
Arg	100
Asn	100
Asp	9
Glu	100
Gly	100
His	100
Ile	100
Leu	100
Met	100
Phe	100
Pro	100
Ser	100
Thr	100
Trp	100
Tyr	100
Val	100
20 standard amino acids	100

Die Analyse ergab für die gesamten 344 Codons der *cre*-Sequenz 71 sehr selten (<10) und 98 selten (<20) verwendete Codons. Um eine Anpassung der *cre*-Sequenz an die Codon Usage von *C. reinhardtii* zu erreichen, wurde mit Hilfe des Programms Oligocreator die Aminosäuresequenz der Cre-Rekombinase in eine an das *C. reinhardtii*-Genom angepasste Codonverwendung übersetzt (Dr. Markus Fuhrmann, persönliche Mitteilung). Diese codonoptimierte *c cre*-Sequenz wurde erneut mit dem „graphical codon usage analyzer“ untersucht (siehe Abb. 3.5-b sowie im Anhang).

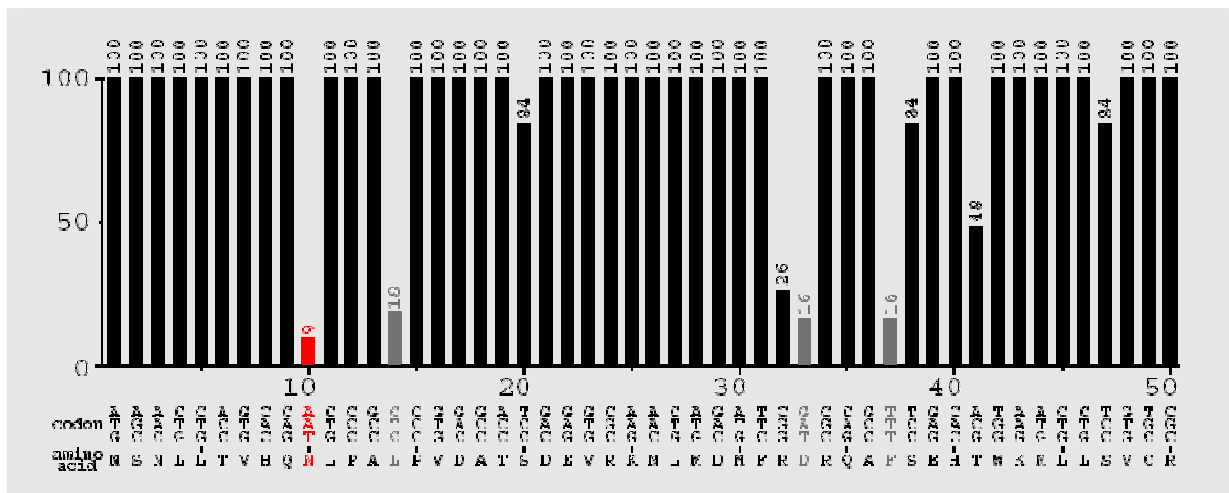


Abb. 3.5-b Vergleich der relativen Häufigkeit der verwendeten Codons in der codonoptimierten *ccre*-Sequenz im Vergleich zur Codon Usage von *C. reinhardtii* (dargestellt für Codon 1-50).

Die Anzahl der sehr selten verwendete Codons wurde von 71 auf sechs reduziert, die der selten verwendeten von 98 auf 19. Die ausgetauschten Basen in der *ccre*-Sequenz für die ersten 50 Codons sind in Abb. 3.5-c grau hinterlegt dargestellt. Die gesamte Sequenz befindet sich im ebenfalls im Anhang.

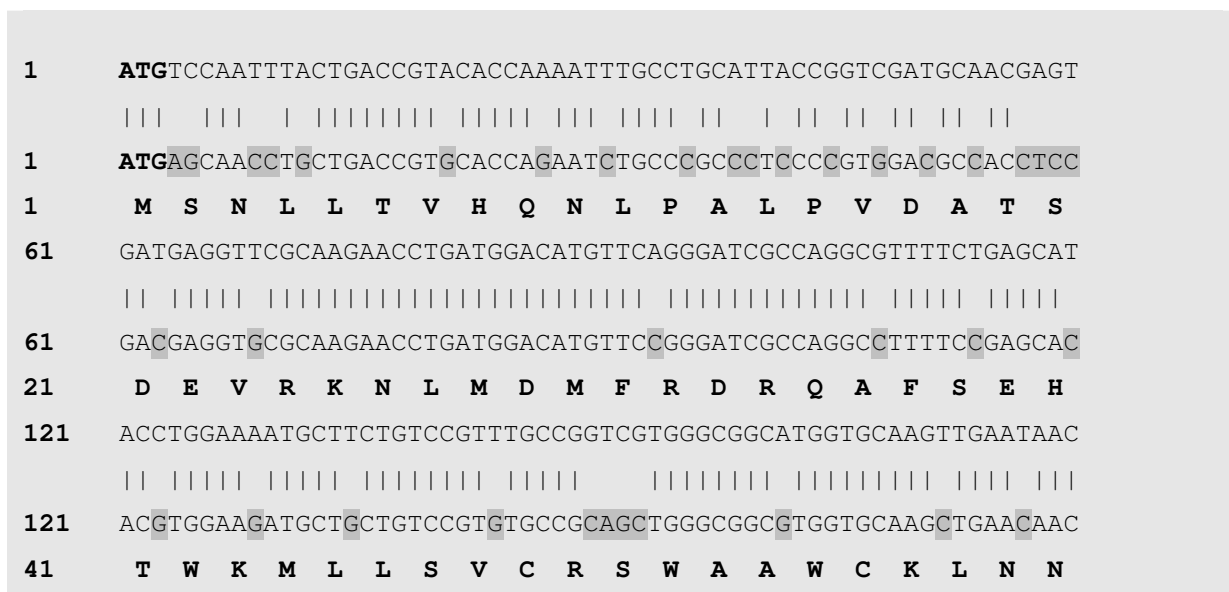


Abb. 3.5-c Vergleich der *cre*-Sequenz aus Bakteriophagen P1 mit der codonoptimierten *ccre*-Sequenz. Substituierte Basen sind grau hinterlegt (dargestellt für Codon 1-50).

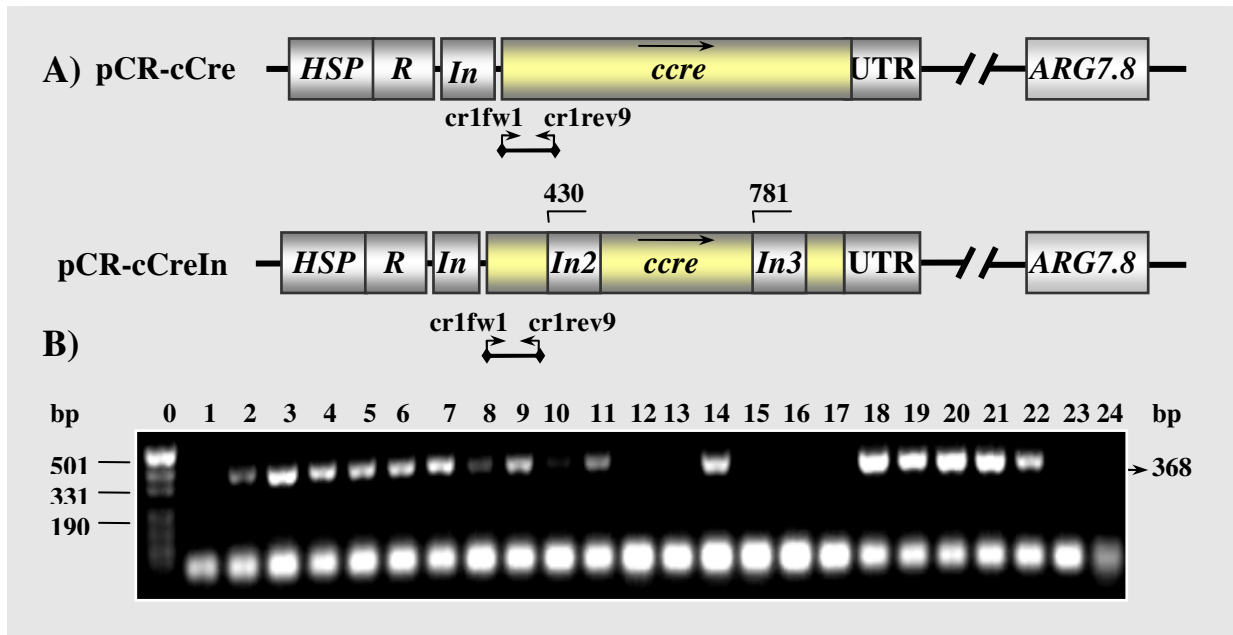
Ausgehend von der *cre*-Sequenz wurde das Gen synthetisch aus HPLC-gereinigten, überlappenden Oligonukleotiden mittels der in Fuhrmann et al. beschriebenen Methode hergestellt (42). Die Gensynthese erfolgte aufgrund einer Größe von 1048bp in zwei separaten Teilen, *ccre1* und *ccre2*. Das genaue Prinzip der Gensynthese ist detailliert unter 6.3.1 beschrieben.

### 3.5.2 Expressionsvektoren für die codonoptimierte cCre

Für die Integration des codonoptimierten *cCre*-Gens in das *C. reinhardtii*-Genom wurde wiederum das Plasmid pSI105 als Expressionsvektor mit *ARG7.8* als Auxotrophiemarker verwendet. Der resultierende Expressionsvektor pCR-cCre ist in Abb. 3.5-d Teil A dargestellt. Zur weiteren Optimierung der Genexpression wurde noch ein zweiter Expressionsvektor pCR-cCreIn konstruiert. Das *cCreIn*-Gen enthält dabei zwei zusätzliche Intronsequenzen, Intron2 (Position 430 im *cCre*-Gen) und Intron3 (Position 781) aus dem *Chlamydomonas-RBCS2*-Gen entsprechend ihrer natürlichen Abfolge. Für das Luciferasegen konnte so nämlich eine 4-5-fach höhere Expressionsmenge erreicht werden, wenn diese Intronsequenzen in die kodierende Region integriert wurden (32).

Die Transformationen mit den Plasmiden pCR-cCre und pCR-cCreIn erfolgten zunächst im Stamm *cw15Arg<sup>-</sup>A*. Der Expressionsvektor mit der unveränderten *cre*-Sequenz pCR-Cre wurde ebenfalls als Vergleich zur Bestimmung der Transformationseffizienz mitverwendet. Nach 6-8 Tagen konnten für *cw15Arg<sup>+</sup>-Cre* 326, für *cw15Arg<sup>+</sup>-cCre* 286 und für *cw15Arg<sup>+</sup>-cCreIn* 301 argininprototrophe Transformanten auf TAP-Medium selektiert werden. Die Anzahl der Transformanten lag also für alle drei *cre*-Expressionsvektoren in der gleichen Größenordnung. Es wurden jeweils 24 Transformanten der Linien *cw15Arg<sup>+</sup>-cCre* und *cw15Arg<sup>+</sup>-cCreIn* für weitere Analysen in TAP-Flüssigmedium kultiviert. Die argininprototrophen Transformanten wurden mit Hilfe der PCR-Reaktion auf die Kointegration des *cCre*-Gens bzw. des *cCreIn*-Gens untersucht. Mit den Syntheseoligonukleotiden cr1fw1 und cr1rev9 konnten 368bp vom 5'-Ende des *cCre*-Gens für 15 von 24 *cw15Arg<sup>+</sup>-cCre*-Transformanten nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.5-d Teil B). Von diesen 15 Algenkulturen wurden acht hinsichtlich einer Genexpression des *cCre*-Gens immunologisch in einem Western Blot mit dem anti-Cre-Antikörper analysiert. Auch in diesem Fall konnte für keine der acht *cw15Arg<sup>+</sup>-cCre*-Transformanten bei der erwarteten Größe von 38kDa eine Bande detektiert werden (nicht gezeigt).

Für die *cw15Arg<sup>+</sup>-cCreIn*-Transformanten ergab die PCR-Reaktion lediglich zwei positive Klone, welche die 368bp des 5'-Endes vom *cCreIn*-Gen enthielten. Von diesen zwei sowie sechs weiteren *cw15Arg<sup>+</sup>-cCreIn*-Transformanten wurden je 2ml Algenkulturen mit dem anti-Cre-Antikörper im Western Blot untersucht. Auch hier konnte für keine der Transformanten eine Cre-Expression nachgewiesen werden (nicht gezeigt).



**Abb. 3.5-d Expressionsvektoren mit dem codonoptimierten *ccre*-Gen.** A) pCR-cCreIn enthält im Gegensatz zu pCR-cCre noch Intron2 (Position 430 im *ccre*-Gen) und Intron3 (Position 781 im *ccre*-Gen) aus dem *RBCS2*-Gen. B) Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Reaktionen (Syntheseoligonukleotide: cr1fw1 und cr1rev9) für die 24 *cw15Arg*<sup>+</sup>-cCre-Transformanten: Spur 0) DNA-Molekulargewichtsstandard, Spur 2)-9), 11), 14), 18)-22) positiv auf das 5'-Ende des *ccre*-Gens und Spur 1), 10), 12), 13), 15)-17), 23) und 24) negativ auf das 5'-Ende des *ccre*-Gens.

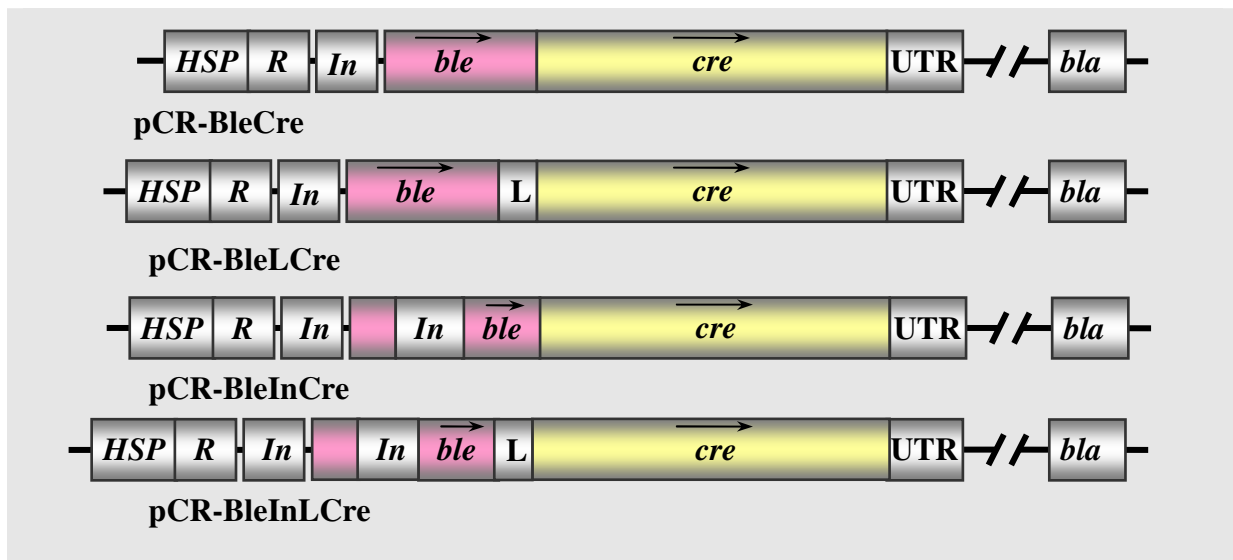
### 3.6 Expression von Ble-Cre in *C. reinhardtii*

Da mit den Expressionsvektoren pCR-Cre, pCR-cCre und pCR-cCreIn unter Selektion auf argininprototrophe Transformanten keine Koexpression der Cre-Rekombinase in *C. reinhardtii* nachgewiesen werden konnte, wurde das *cre*-Gen mit dem Selektionsmarker *ble* fusioniert. Die Selektion auf Zeozin gewährleistet die Expression des Fusionsproteins Ble-Cre. Zusätzlich fungiert das *ble*-Gen als Kernlokalisierungssequenz. Als Kontrollvektor diente das Plasmid pXX37, bei dem bereits die korrekte Expression des Fusionsproteins Ble-rLuc nachgewiesen wurde (siehe Abb. 3.1-c). Für die Expression des Ble-Cre-Fusionsproteins wurde sowohl das *cre*-Gen (Originalsequenz aus dem Bakteriophagen P1) als auch das *ccre*-Gen (codonoptimiert an das *C. reinhardtii*-Genom) am 5'-Ende mit dem *ble*-Gen verknüpft. Die Rekombinaseaktivität des Ble-Cre-Fusionsproteins (mit nichtcodonoptimiertem *cre*-Gen) wurde bereits im *in vivo* Rekombinationsassay in *E. coli* nachgewiesen (siehe 3.3.1).

#### 3.6.1 Expressionsvektoren mit *ble-cre*

Für die Expression des Ble-Cre-Fusionsproteins in *C. reinhardtii* wurden die Plasmide pCR-BleCre und pCR-BleLCre (mit „linker“) verwendet. Lumbreras et al. hatten gezeigt, dass die zusätzliche Verwendung des *RBCS2*-Intron1 im *ble*-Gen selbst zu einer höheren Stabilität der Genexpression und zu einer Erhöhung der Transformationsrate unter Zeozinselektion führt

(94). Daher wurden als weitere *ble-cre*-Expressionsvektoren die Plasmide pCR-BleInCre und pCR-BleInLCre mit einer zusätzlichen Kopie des Intron1 im *ble*-Gen verwendet (siehe Abb. 3.6-a). Die Transformation der Expressionsvektoren pCR-BleCre, pCR-BleLCre, pCR-BleInCre und pCR-BleInLCre sowie der Plasmidkontrolle pXX37 erfolgte unter Zeozinselektion (5µg/ml) im Stamm *cw15Arg<sup>-</sup>A*. Nach 10-14 Tagen konnten mit Ausnahme des Plasmids pCR-BleLCre wenige zeozinresistente Einzelkolonien erhalten werden. Die Transformanten *cw15Arg<sup>-</sup>A*-BleCre, -BleInCre, -BleInLCre konnten aber nicht in Flüssigkultur unter Selektionsdruck (Zeozin 2,5µg/ml) kultiviert werden. Das Kontrollplasmid pXX37 ergab über 50 zeozinresistente Transformanten, von denen aber ebenfalls die Hälfte nach der Kultivierung unter Selektionsdruck abstarb. Die *cw15Arg<sup>-</sup>A*-Transformanten mit den BleCre- bzw. Ble-crLuc-Konstrukten wurden deshalb nicht weiter analysiert, da der Stamm für die Selektion von zeozinresistenten Transformanten eine zu niedrige Transformationsseffizienz aufwies (siehe auch 3.1).



**Abb. 3.6-a Verschiedene Expressionsvektoren für das Ble-Cre-Fusionsprotein in *C. reinhardtii*.** HSP-R-In = *HSP70A/RBCS2*-Tandempromotor mit Intron1, UTR = 3'-UTR des *RBCS2*-Gens, L = „linker“, bla = Ampicillinresistenzgen, ble = Resistenzgen für Zeozin, cre = Gen für Cre-Rekombinase.

Dagegen ließen sich mit dem Stamm *cw15<sup>+</sup>* für die Selektion auf Zeozin gute Transformationsraten erzielen. Nach 6-8 Tagen konnten bereits für alle Konstrukte zeozinresistente Transformanten selektiert werden, welche in Flüssigkultur unter Selektionsdruck mit 2,5µg/ml Zeozin kultiviert wurden (siehe Tab. 3.6-a). Für den Kontrollstamm *cw15<sup>+</sup>*-BlecrLuc (Plasmid pXX37) konnte zudem eine stabile Ble-Expression unter Selektionsdruck nachgewiesen werden. Dagegen zeigten die verschiedenen *cw15<sup>+</sup>*-BleCre-Transformanten nicht für alle untersuchten Kulturen einen stabilen zeozinresistenten Phänotyp. Wie in Tab. 3.6-a zu sehen, sind für die Linie *cw15<sup>+</sup>*-BleCre 18 von 27, für -

BleLCre nur 11 von 41, für -BleInCre 19 von 47 und für -BleInLCre 26 von 42 Transformanten in Flüssigkultur mit Zeozin angewachsen.

Transformanten <i>cw15<sup>+</sup></i> -	Zeozinresistenz auf Platte [5µg/ml]	Zeozinresistenz in Flüssigkultur [2,5µg/ml]
<b>BleCre</b>	52	18/27
<b>BleLCre</b>	84	11/41
<b>BleInCre</b>	80	19/47
<b>BleInLCre</b>	51	26/42
<b>BlecrLuc</b>	~800	12/12

**Tab. 3.6-a Transformationsergebnis von *ble-cre*-Expressionsvektoren** und des Kontrollvektors pXX37 im Stamm *cw15<sup>+</sup>*.

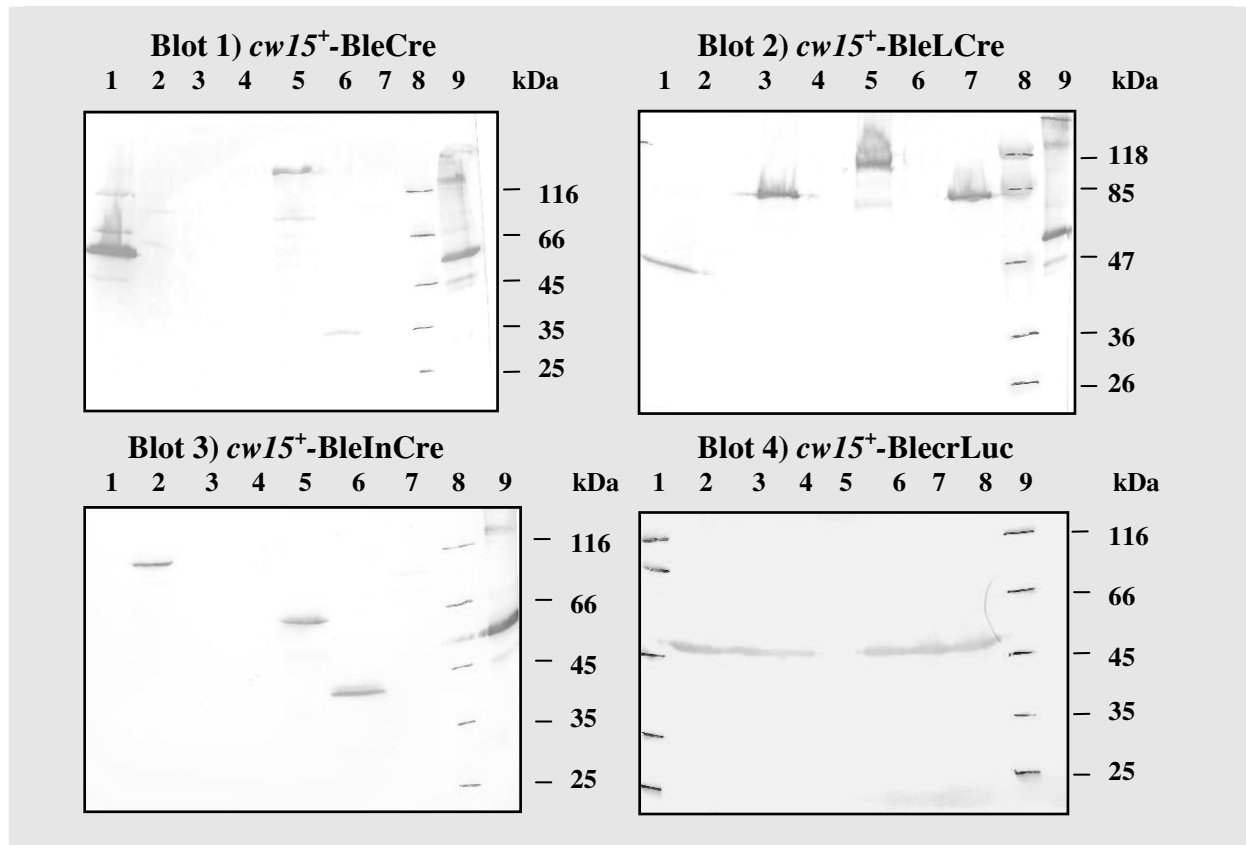
Die Verwendung von Intron1 im *ble*-Gen scheint in diesem Fall für die *ble-cre*-Fusionsgene zu keiner Verbesserung der Stabilität der Genexpression zu führen. Die Anzahl der zeozinresistenten Transformanten liegt für alle vier Konstrukte in einer ähnlichen Größenordnung. Die Integration eines Abstandshalters zwischen dem *ble*- und dem *cre*-Gen führte ebenfalls zu keinem Vorteil bezüglich der Anzahl zeozinresistenter Transformanten. Es fällt aber auf, dass die Transformantenzahl im Vergleich zum Kontrollansatz mit dem *ble-crluc*-Gen um einen Faktor 10 bis 15 niedriger war. Dieser Unterschied konnte bei der Wiederholung der Transformationen unter gleichen Bedingungen bestätigt werden (nicht gezeigt). Zur Untersuchung der korrekten Expression der Ble-Fusionsproteine wurden die Transformanten *cw15<sup>+</sup>*-BleCre-, -BleLCre-, -BleInCre (welche in Flüssigkultur weiterhin Zeozinresistenz aufwiesen) sowie die Kontrolle -BlecrLuc im Immunoblot analysiert. Die Detektion erfolgte mit einem Antikörper der Firma Cayla gegen das Ble-Protein. Die Ergebnisse sind in Tab. 3.6-b zusammengefasst. Die immunologische Untersuchung ergab für keine der untersuchten Transformanten eine Bande im erwarteten Molekulargewichtsbereich von 53kDa (abgebildet in Blot1-3) für die ersten sechs Transformanten von *cw15<sup>+</sup>*-BleCre-, -BleLCre- und -BleInCre, zeozinresistente *cw15<sup>+</sup>*-BleInLCre-Transformanten wurden nicht immunologisch untersucht).

Im Gegensatz dazu wurde in allen analysierten *cw15<sup>+</sup>*-BlecrLuc-Transformanten das Fusionsprotein Ble-rLuc in seiner korrekten Größe von 52kDa nachgewiesen (siehe Blot 4) Transformanten Nr. 1-6). Zur Verifizierung der Ergebnisse wurden die *cw15<sup>+</sup>*-BlecrLuc-Transformanten parallel mit einem anti-*Renilla*-Luciferase-Antikörper immunologisch

untersucht, die erwartete Bande bei 52kDa konnte für alle Transformanten bestätigt werden (Western Blot nicht gezeigt).

**Signal mit dem anti-Ble-Antikörper (soll: 53kDa)**

<b>Blot 1): BleCre</b>	Für zwölf von 18 positives Signal. Aber die detektierten Banden lagen in einem Molekulargewichtsbereich von 35kDa bis >100kDa.
<b>Blot 2): BleLCre</b>	Für sieben von elf positives Signal. Die Banden waren ebenfalls in einem Molekulargewichtsbereich von 45kDa bis >100kDa verteilt.
<b>Blot 3): BleInCre</b>	Für sechs von 19 positives Signal. Die Banden waren ebenfalls in einem Molekulargewichtsbereich von 45kDa bis >100kDa verteilt.
<b>Blot 4): BlecrLuc</b>	Für zwölf von zwölf positives Signal. Die Banden wiesen alle die erwartete Größe von 52kDa für Ble-rLuc auf.

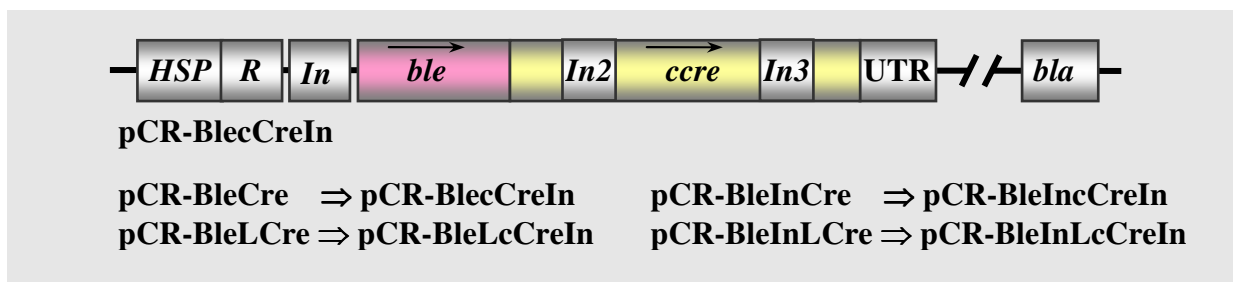


**Tab. 3.6-b Detektion von Ble-Fusionsproteinen** exprimiert in zeozinresisten *cw15*<sup>+</sup>-Transformanten im Western Blot (anti-Ble-Antikörper, 1:1000). Blot 1-3): Spur 1), 2), 3), 5), 6) und 7) zeozinresistente BleCre-Transformanten (Nr. 1-6), Spur 4) *cw15*<sup>+</sup> untransformiert, Spur 8) Proteinstandard und Spur 9) aufgereinigtes Ble-Cre-Protein aus *E. coli* als Positivkontrolle. Es konnte für keine der untersuchten BleCre-Transformanten das korrekt exprimierte Ble-Cre-Protein mit einer Größe von 53kDa detektiert werden. Blot 4): Spur 1), 2), 3), 5), 6) und 7) zeozinresistente *cw15*<sup>+</sup>-BlecrLuc-Transformanten (Nr. 1-6), Spur 4) *cw15*<sup>+</sup> untransformiert und Spur 8) Proteinstandard. Alle sechs Transformanten exprimierten das Fusionsprotein Ble-rLuc in der korrekten Größe von 52kDa.

Da die Transformation der verschiedenen *ble-cre*-Expressionsvektoren unter Verwendung der *cre*-Originalsequenz aus dem Bakteriophagen P1 zu keiner korrekten Expression des Ble-Cre-Fusionsproteins führte, wurde die *cre*-Sequenz durch die codonoptimierte *ccre*-Sequenz ersetzt. Möglicherweise konnte infolge der unpassenden Codonverwendung für *C. reinhardtii* keine stabile Integration für das vollständige *ble-cre*-Gen stattfinden.

### 3.6.2 Expressionsvektoren mit *ble-ccreIn*

Um einen möglichen negativen Einfluss bedingt durch die fehlende Codonoptimierung des *cre*-Gens ausschließen zu können, wurde die ursprüngliche *cre*-Sequenz der vier verschiedenen Expressionsvektoren (siehe Abb. 3.6-a) durch das codonoptimierte *ccreIn*-Gen mit den beiden zusätzlichen *RBCS2*-Introns aus dem Vektor pCR-cCreIn ersetzt (siehe Abb. 3.5-d). Die resultierenden Expressionsvektoren für das Ble-cCre-Fusionsprotein sind am Beispiel von pCR-BlecCreIn in Abb. 3.6-b dargestellt.



**Abb. 3.6-b Expressionsvektoren für das Ble-Cre-Fusionsprotein in *C. reinhardtii*.** Das *cre*-Gen (aus dem Bakteriophagen P1) wurde durch die codonoptimierte *ccre*-Sequenz mit zwei zusätzlichen Introns ersetzt. Ansonsten entsprechen die Plasmide denen unter Abb. 3.6-a.

Die Transformation der Plasmide pCR-BlecCreIn, pCR-BleLcCreIn, pCR-BleIncCreIn und pCR-BleInLcCreIn sowie des Kontrollplasids pXX37 erfolgte diesmal direkt im *cw15<sup>+</sup>*-Stamm unter Selektion auf Zeozin (5µg/ml). Nach 6-8 Tagen konnten für alle Vektoren zeozinresistente Transformanten erhalten werden (siehe Tab. 3.6-c). Bei der Transformation mit dem Kontrollplasmid pXX37 wurde wiederum die fünf bis zehnfache Anzahl an zeozinresistenten Transformanten erhalten, welche nicht weiter analysiert wurden.

Die Zahl der zeozinresistenten Transformanten für das *ble-ccreIn*-Gen lag bei gleich transformierter DNA-Menge um den Faktor 2-3 höher als bei der Transformation mit den nichtcodonoptimierten *ble-cre*-Vektoren (siehe auch Tab. 3.6-a).



Für die weitere Analyse wurden jeweils zwölf Transformanten eines jeden Plasmids in TAP-Flüssigmedium mit 2,5µg/ml Zeozin kultiviert. Der Kontrollstamm *cw15<sup>+</sup>*-BlecrLuc wurde nicht weiter analysiert. Wie in Tab. 3.6-c dargestellt, zeigte für alle *ble-ccreIn*-Expressionsvektoren jeweils nur jede dritte Transformante ein stabiles Wachstum auf antibiotikahaltigem Flüssigmedium.

<b>Transformanten <i>cw15<sup>+</sup></i>-</b>	<b>Zeozinresistenz auf Platte [5µg/ml]</b>	<b>Zeozinresistenz in Flüssigkultur [2,5µg/ml]</b>
<b>BleCcreIn</b>	106	4/12
<b>BleLcCreIn</b>	241	4/12
<b>BleIncCreIn</b>	104	4/12
<b>BleInLcCreIn</b>	122	4/12
<b>BlecrLuc</b>	928	nicht analysiert

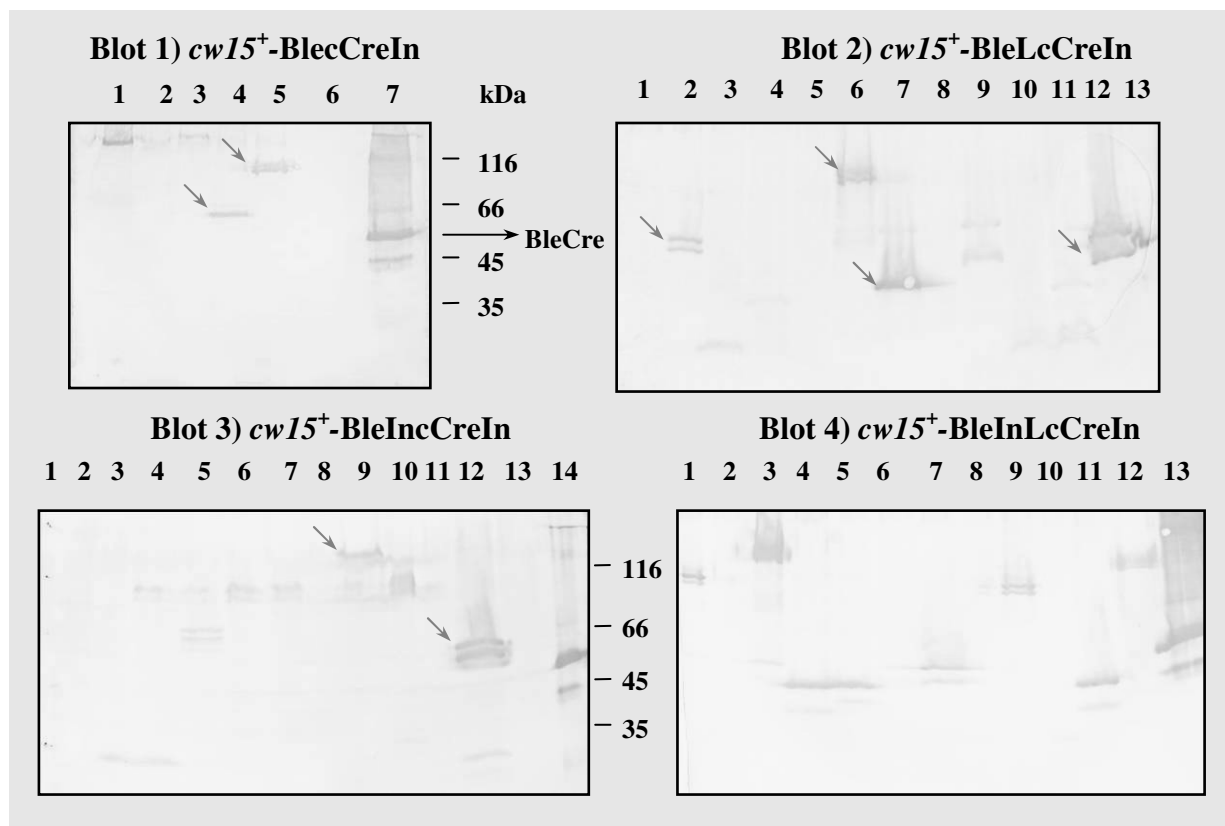
**Tab. 3.6-c Transformationsergebnis von *ble-ccreIn*-Expressionsvektoren** und der Kontrolle pXX37 im Stamm *cw15<sup>+</sup>*.

Von allen 12 Transformanten des jeweiligen Konstruktes wurde das Zellysate von 2ml Algenkultur in einem 10%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Anschließend erfolgte die immunologische Detektion mittels Western Blot mit einem anti-Ble-Antikörper auf die korrekte Expression des Ble-cCre-Fusionsproteins. Die Ergebnisse sind in Tab. 3.6-d zusammengefasst.

Wie bereits für die Ble-Cre-Fusionsproteine konnten für die verschiedenen *ble-ccreIn*-Expressionsvektoren Ble-Fusionsproteine mit einem Molekulargewicht von 15 bis 100kDa detektiert werden. Für die Transformanten, deren Signale zwischen 50 und 60kDa lagen, oder die ein sehr starkes Signal mit dem anti-Ble-Antikörper ergaben (siehe Blot 1-3, entsprechende Banden sind mit einem Pfeil markiert), wurde ein weiterer Western Blot mit dem selbsthergestellten anti-Cre-Antikörper durchgeführt. Die Immunodetektion ergab für die Transformanten *cw15<sup>+</sup>*-BleIncCreIn Nr. 9 und 12 eindeutige Signale mit dem anti-Cre-Antikörper, siehe Tab. 3.6-e. Für die restlich untersuchten Transformanten konnten nur sehr schwache Signale detektiert werden (mit Pfeilen markiert), welche das gleiche Molekulargewicht aufwiesen, wie die vom anti-Ble-Antikörper detektierten Banden.

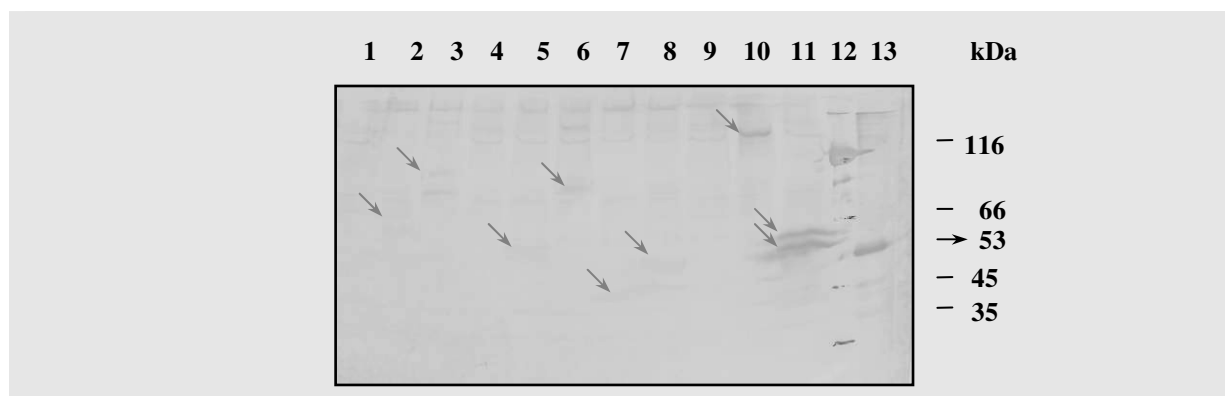
**Signal mit dem anti-Ble-Antikörper (soll: 53kDa)**

<b>Blot 1): BlecCreIn</b>	Für acht von zwölf positives Signal. Aber die detektierten Banden lagen in einem Molekulargewichtsbereich von 35kDa bis >100kDa. <u>Nr. 11 <math>\approx</math> 65kDa</u>
<b>Blot 2): BleLcCreIn</b>	Für neun von zwölf positives Signal. Die Banden waren ebenfalls in einem Molekulargewichtsbereich von 25kDa bis >100kDa verteilt. <u>Nr. 2, 9, 12 im Bereich von 50-60kDa</u>
<b>Blot 3): BleIncCreIn</b>	Für acht von zwölf positives Signal. Die Banden waren ebenfalls in einem Molekulargewichtsbereich von 15kDa bis >100kDa verteilt. <u>Nr. 12 im Bereich von 55-60kDa</u>
<b>Blot 4): BleInLcCreIn</b>	Für acht von zwölf positives Signal. Die Banden waren ebenfalls in einem Molekulargewichtsbereich von 45kDa bis >100kDa verteilt. Kein Transformant in dem gesuchten Bereich von 53kDa.



**Tab. 3.6-d Detektion von Ble-cCre-Fusionsproteinen** im Western Blot (anti-Ble-Antikörper, 1:1000). Blot 1): Spur 1-5) Transformanten Nr. 8-12 (Nr. 1-7 nicht dargestellt), 6) Kontrolle *cw15*<sup>+</sup>, 7) Ble-Cre-Protein aus *E. coli*. Blot 2): Spur 1-12) Transformanten Nr. 1-12, 13) Ble-Cre-Protein aus *E. coli*. Blot 3): Spur 1-12) Transformanten Nr. 1-12, 13) Kontrolle *cw15*<sup>+</sup>, 14) Ble-Cre-Protein aus *E. coli*. Blot 4): Spur 1-12) Transformanten Nr. 1-12, 13) Ble-Cre-Protein aus *E. coli*.

Signal mit dem anti-Cre-Antikörper (soll: 53kDa)	
<b>BlecCreIn</b>	Nr. 11 Bande bei 65kDa, Nr. 12 Doppelbande bei ca. 100kDa
<b>BleLcCreIn</b>	Nr. 2 Doppelbande bei ca. 55-60kDa, schwach Nr. 6 Doppelbande bei ca. 80-90kDa, schwach Nr. 7 Bande bei 45kDa, schwach Nr. 12 Doppelbande bei ca. 55-60kDa, schwach
<b>BleIncCreIn</b>	Nr. 9 Bande bei ca. 116kDa Nr. 12 Doppelbande bei ca. 55-60kDa



**Tab. 3.6-e Detektion von Ble-cCre-Fusionsproteinen mit einem anti-Cre-Antikörper (1:1000).** Spur 1) Kontrolle *cw15*<sup>+</sup>, 2) und 3) *cw15*<sup>+</sup>-BlecCreIn Nr. 11 und 12. 4) *cw15*<sup>+</sup>, 5), 6), 7) und 8) *cw15*<sup>+</sup>-BleLcCreIn Nr. 2, 6, 7 und 12. 9) *cw15*<sup>+</sup>, 10) und 11) *cw15*<sup>+</sup>-BleIncCreIn Nr. 9 und 12. 12) Proteinstandard und 13) Ble-Cre-Protein aus *E. coli*. Bei der korrekten Expression des Ble-cCre-Fusionsproteins sollte eine Bande von 53kDa zu erkennen sein. Die jeweiligen Banden waren von der Intensität für die elektronische Dokumentation zu schwach, daher wurde der Molekulargewichtsbereich der jeweiligen Bande mit einem Pfeil markiert.

Da die Western Blot-Analyse mit beiden Antikörpern für alle untersuchten Transformanten wieder eine große Varianz im Molekulargewicht des Signals aufzeigte, wurde von den bisher analysierten Algenkulturen die genomische DNA isoliert und mit Hilfe von PCR-Reaktionen die vollständige Integration des *ble-cCreIn*-Fusionsgens untersucht (siehe Tab. 3.6-f). Mit der ersten PCR-Reaktion (PCR1, Oligonukleotide: bleEndefw und chlcre1rev) konnte für alle untersuchten Transformanten die erwartete Bande von 474bp ohne bzw. 516 bp mit „linker“ für den Bereich vom 3'-Ende des *ble*-Gens bis zum 5'-Anfang des *cCreIn*-Gens nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Dagegen konnte mit einer zweiten PCR (PCR2, bleEndefw und cr2rev9) vom 3'-Ende des *ble*-Gens beginnend bis zur Mitte des *cCreIn*-Gens keine spezifische Bande im Größenbereich von 1140bp ohne bzw. 1182bp mit „linker“ amplifiziert werden.

	PCR1: bleEndefw/chlcre1rev	PCR2: bleEndefw/cre2rev9
<b>BlecCreIn</b>	Nr. 11 und 12, positiv	unspezifische Doppelbanden im Bereich von 500-700bp, keine Amplifikation im erwarteten Größenbereich.
<b>BleLcCreIn</b>	Nr. 2 und 12, positiv Nr. 6 und 7, unspezifische Reaktion	
<b>BleIncCreIn</b>	Nr. 9 und 12, positiv	

**Tab. 3.6-f Untersuchung von zeozinresisten *cw15<sup>+</sup>*-Transformanten** mit PCR-Reaktionen über Bereiche des *ble-ccreIn*-Fusionsgens. Erste PCR-Reaktion mit bleEndefw und chlcre1rev über das 3'-Ende des *ble*-Gens bis zum 5'-Anfang des *ccreIn*-Gens (474bp ohne bzw. 516 bp mit „linker“). Zweite PCR-Reaktion mit bleEndefw und cr2rev9 ebenfalls vom 3'-Ende des *ble*-Gens bis zur Mitte des *ccreIn*-Gens (1140bp ohne bzw. 1182 bp mit „linker“).

Auch bei der Verwendung des codonoptimierten *ccreIn*-Gen mit zwei zusätzlichen Intronsequenzen im *ble-ccreIn*-Fusionsgen konnte also für keine der Transformanten das Fusionsprotein Ble-cCre in seiner korrekten Größe von 53kDa mit den zuvor beschriebenen Methoden detektiert werden.

Da aber sowohl die Fusionsgene *ble-crluc* als auch *ble-cgfp* zur reproduzierbaren Expression der jeweiligen Fusionsproteine führten (41, 42), könnte ein negativer Einfluss von einer konstitutiv exprimierten Cre-Rekombinase auf die *C. reinhardtii*-Kulturen ausgehen. Weder zusammen mit dem Auxotrophiemarker *ARG7.8* noch als Fusionsprotein Ble-Cre mit dem *ble*-Gen als Selektionsmarker für Zeozin konnte die Cre-Rekombinase koexprimiert werden. Dabei führte auch die Codonoptimierung des *cre*-Gens sowie die Einführung zusätzlicher Intronsequenzen in das *ccre*-Gen zu keiner erfolgreichen Expression der Cre-Rekombinase bzw. des Ble-Cre-Fusionsproteins. Beide Methoden führten bei anderen Transgenen zu einer erheblichen Verbesserung der Expressionsergebnisse.

### 3.7 Expression einer inaktiven cCre\* in *C. reinhardtii*

Bei der ortsgerichteten Rekombination ist eine Vielzahl von spezifischen Aminosäuren der Cre-Rekombinase beteiligt. Ein Tyrosin-Rest (Tyr<sub>324</sub>) ist unter Ausbildung einer 3'-Phosphotyrosin-Bindung für die Spaltung der DNA verantwortlich (57, 175). Silver und Livingston haben gezeigt, dass die Expression der Cre-Rekombinase in verschiedenen Zelllinien (auch ohne vorhandene *lox*-Erkennungssequenzen im Genom) eine toxische Wirkung aufweist (152). Die Substitution des Tyrosins durch die Aminosäure Phenylalanin (Tyr<sub>324</sub>→Phe<sub>324</sub>) führte dagegen zu einer normalen Entwicklung der Zellen.

Um eine mögliche toxische Wirkung einer konstitutiv exprimierten Cre-Rekombinase in *C. reinhardtii* untersuchen zu können, wurde ebenfalls der aktive Tyrosin-Rest (Tyr<sub>324</sub>) durch ein Phenylalanin im *cCre*-Gen ersetzt. Dies sollte die korrekte Expression einer inaktiven Cre-Rekombinase ermöglichen. Es wurde sowohl die Koexpression der inaktiven Cre-Rekombinase mit *ARG7.8* als Selektionsmarker (wie bereits für die aktive Cre-Rekombinase unter 3.4-3.5 beschrieben) als auch die Expression des Fusionsproteins Ble-cCre unter direktem Selektionsdruck auf Zeozin untersucht.

#### 3.7.1 Expressionsvektoren für cCre\* mit *ARG7.8* als Selektionsmarker

Die Einführung einer Punktmutation zum Austausch des Codons TAC (für Tyrosin) zu TTC (für Phenylalanin) erfolgte mit einer ortsgerichteten Mutagenese mit den Oligonukleotiden CreMutfw und CreMutrev. Die Expressionsvektoren für die inaktive Cre-Rekombinase pCR-cCre\* und pCR-cCre\*In entsprechen mit Ausnahme der Punktmutation genau den Vektoren pCR-cCre und pCR-cCreIn (siehe Abb. 3.4-a Teil A). Die Transformation wurde in dem argininauxotrophen *cw15Arg<sup>-</sup>A*-Stamm durchgeführt. Um einen möglichen Einfluss der aktiven Cre-Rekombinase auf die Anzahl der Transformanten im Vergleich zum inaktiven Enzym zu erhalten, wurden die Vektoren pCR-cCre\* und pCR-cCre\*In als auch die bereits untersuchten Plasmide pCR-cCre und pCR-cCreIn für parallele Transformationen verwendet. Nach 6-8 Tagen konnten für *cw15Arg<sup>+</sup>-cCre\** 264 argininprototrophe Einzelkolonien erhalten werden, für -cCre 281 sowie für -cCre\*In 292 und für -cCreIn 273. Nach Einführung der Punktmutation konnte keine signifikante Veränderung in der Anzahl an Transformanten beobachtet werden. Für die weitere Analyse wurden jeweils 24 Einzelkolonien von der *cw15Arg<sup>+</sup>-cCre\**- und der *cw15Arg<sup>+</sup>-cCre\*In*-Transformation in TAP-Flüssigmedium kultiviert. Die Algenkulturen wurden (wie bereits für die Expression der aktiven Cre-Rekombinase unter 3.5 beschrieben) mit einer PCR-Reaktion (PCR1: cr1fw1 und cr1rev9) auf die Integration des *cCre\**- bzw. des *cCreIn\**-Gens untersucht. Für die *cw15Arg<sup>+</sup>-cCre\**-

Transformation konnte bei 15 der 24 untersuchten Algenkulturen ein 368bp großes PCR-Produkt für das 5'-Ende des *cCre*\*-Gens amplifiziert werden (nicht gezeigt). Für acht der 15 Transformanten wurde das Lysat von je 2ml Algenkultur mit der SDS-PAGE in einem 10%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend im Western Blot mit dem anti-Cre-Antikörper untersucht. Für keinen der acht *cw15Arg*<sup>+</sup>-cCre\*-Transformanten konnte das erwartete Signal der inaktiven Cre-Rekombinase bei 38kDa detektiert werden (nicht gezeigt). Die Untersuchung der *cw15Arg*<sup>+</sup>-cCre\*In-Transformanten führte zu einem ähnlichen Ergebnis. Die PCR-Reaktion über den 5'-Bereich des *cCre*\*In-Gens ergab nur für zwei von 24 untersuchten Transformanten die erwartete Bande bei 368bp. Für die Untersuchung der Cre-Expression wurden diese zwei und sechs weitere Transformanten mit dem anti-Cre-Antikörper untersucht (nicht gezeigt). Es konnte, wie bereits für die *cw15Arg*<sup>+</sup>-cCre, -cCreIn und -cCre\*-Transformanten keine Bande für die Cre-Rekombinase detektiert werden.

### 3.7.2 Expressionsvektoren für Ble-cCre\*

Da unter fehlendem Selektionsdruck auch für die inaktive Cre-Rekombinase keine Expression in *C. reinhardtii* nachgewiesen werden konnte, wurde (wie bereits für die Fusionsproteine Ble-Cre und Ble-cCre unter 3.6 beschrieben) das *cCre*In\*-Gen mit *RBCS2*-Intron2 und 3 mit dem 3'-Ende des *ble*-Gens fusioniert. Die Expressionskassetten für das inaktive Ble-cCre\*-Fusionsprotein entsprachen, mit Ausnahme der eingeführten Punktmutation, den Vektoren pCR-BleLcCreIn und pCR-BleInLcCreIn (siehe Abb. 3.6-b). Die Transformation erfolgte mit den Plasmiden pCR-BleLcCre\*In und pCR-BleLcCreIn als Kontrolle sowie pCR-BleInLcCre\*In und pCR-BleInLcCreIn als Kontrolle in dem Stamm *cw15*<sup>+</sup>, der gute Transformationsraten für die Selektion auf Zeozin (5µg/ml) aufweist. Nach 6-8 Tagen konnten für alle vier Vektoren zeozinresistente Einzelkolonien erhalten werden (siehe Tab. 3.7-a).

Transformanten <i>cw15</i> <sup>+</sup> -	Zeozinresistenz auf Platte [5µg/ml]	Zeozinresistenz in Flüssigkultur [2,5µg/ml]
BleLcCre*In	232	15/48
BleLcCreIn	256	nicht weiter analysiert
BleInLcCre*In	265	11/48
BleInLcCreIn	267	nicht weiter analysiert

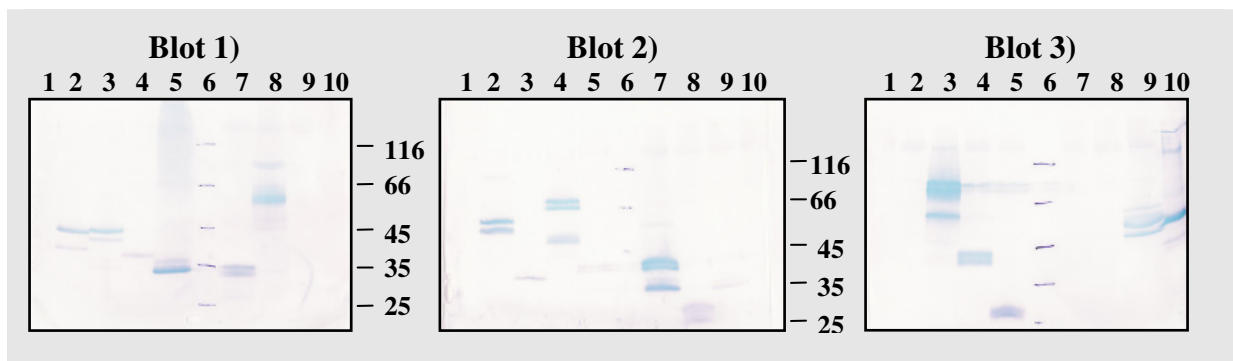
Tab. 3.7-a Transformation von *ble-cCre*In\*-Expressionsvektoren und den *ble-cCre*In-Vektoren im direkten Vergleich im Stamm *cw15*<sup>+</sup>.

Die Anzahl der Transformanten lag wieder in einer ähnlichen Größenordnung, der Austausch des aktiven Tyrosin-Rests führte zu keiner Verbesserung der Transformationszahl. Für die Untersuchung der Expression der Ble-cCre\*-Fusionsproteine wurden je 48 der zeozinresistenten *cw15*<sup>+</sup>-BleLcCre\*In und -BleInLcCre\*In unter anhaltendem Selektionsdruck in TAP-Flüssigmedium (mit 2,5µg/ml Zeozin) kultiviert. Von den 48 untersuchten Kulturen konnten für *cw15*<sup>+</sup>-BleLcCre\*In 15 Transformanten selektiert werden, welche Ble-cCre\* stabil zu exprimieren schienen. Für die *cw15*<sup>+</sup>-BleInLcCre\*-Linie konnten elf Transformanten selektiert werden. Für mehr als zwei Drittel konnte also unter anhaltendem Selektionsdruck keine stabile Expression des Ble-cCre\*-Fusionsproteins erhalten werden. Von den 15 zeozinresistenten *cw15*<sup>+</sup>-BleLcCreIn\*In-Transformanten wurden zwölf und für *cw15*<sup>+</sup>-BleInLcCreIn\* alle elf Transformanten bezüglich der korrekten Ble-cCre\*-Expression im Western Blot untersucht. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

## Signal mit dem anti-Ble-Antikörper (soll: 53kDa)

**Blot 1) und Blot 2):** Für zehn von zwölf zeozinresistenten Transformanten konnten **BleLcCre\*In** Signale in einem Molekulargewichtsbereich von ca. 35-80kDa detektiert werden. Sieben der zehn Transformanten exprimierten ein Ble-Fusionsprotein, welches kleiner als 45kDa war. Für Nr. 6, 9 und 11 wurden Proteine in einem MW von ca. 50-66kDa detektiert.

**Blot 2) und Blot 3):** Für sieben von elf zeozinresistenten Transformanten konnten Signale **BleInLcCre\*In** in einem MW von ca. 25-80kDa detektiert werden. Für fünf der sieben Transformanten hatte das Ble-Fusionsprotein ein MW kleiner als 45kDa. Nr. 11 ergab eine Doppelbande bei ca. 53kDa.



**Abb. 3.7-a Detektion von Ble-cCre\*-Fusionsproteinen mit dem anti-Ble-Antikörper (1:1000) im Western Blot.** Blot 1): Spur 1) Kontrolle *cw15*<sup>+</sup>, 2-5) BleLcCre\*In-Transformanten Nr. 1-4, 6) Proteinstandard, 7-10) BleLcCre\*In-Transformanten Nr. 5-8. Blot 2): Spur1) *cw15*<sup>+</sup>, 2-5) Transformanten Nr. 9-12, 6) Proteinstandard, 7-10) BleInLcCre\*In-Transformanten Nr. 1-4. Blot 3): Spur1) *cw15*<sup>+</sup>, 2-5) BleLcCre\*In-Transformanten Nr. 5-8, 6) Proteinstandard, 7-9) BleInLcCre\*In-Transformanten Nr. 9-11 und 10) Ble-Cre-Protein aus *E. coli* als Positivkontrolle.

Wie in Blot 1 bis Blot 3 in Abb. 3.7-a zu erkennen ist, wurde auch mit der inaktiven Cre-Rekombinase das Ble-cCre\*-Fusionsprotein nicht in seiner korrekten Größe von 53kDa exprimiert. Es scheint, wie bereits für die Ble-Cre- und Ble-cCre-Fusionsproteine unter 3.6 erwähnt, unter dem Selektionsdruck auf Zeozin zu einer Selektion für „falschpositive“-Transformanten zu kommen. Es konnten nur Transformanten identifiziert werden, die zwar das Ble-Protein exprimierten, die inaktive Cre-Rekombinase als Teil des Fusionsproteins war aber immer nur zu einem gewissen Anteil vorhanden. Der Austausch des aktiven Tyrosin-Rests zu Phenylalanin scheint nicht auszureichen, um den möglicherweise toxischen Effekt, der von der Cre-Rekombinase ausgeht, zu beseitigen. Keine der Kulturen wurde weiter analysiert.

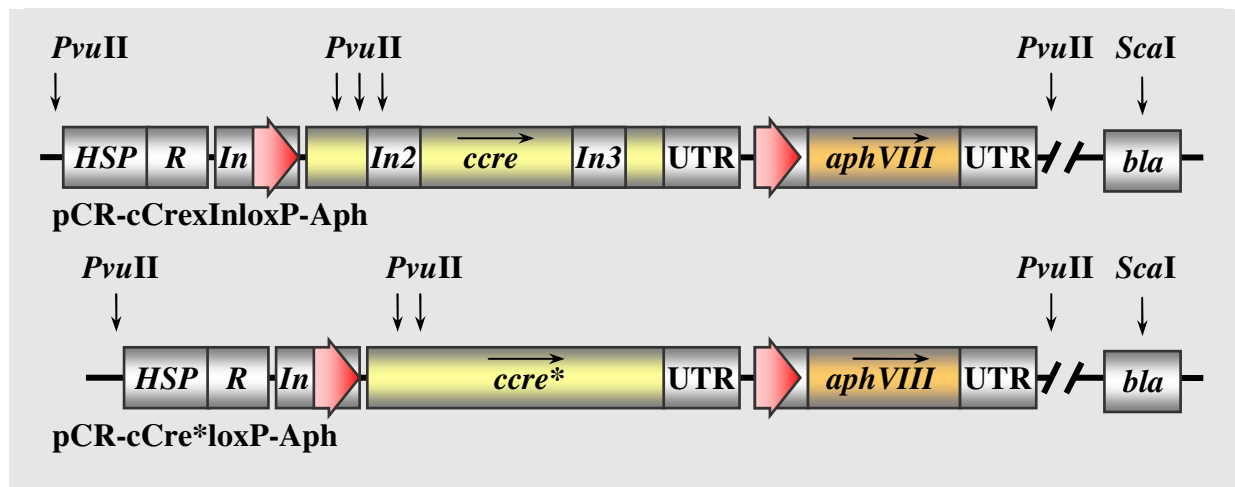


### 3.8 „Cre-Selbsteliminierungs“-Strategie im *cw15<sup>+</sup>*-Stamm

Eine dauerhafte Expression der Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des konstitutiven HSP-R-In-Tandempromotors führte in *C. reinhardtii* wahrscheinlich: zum Absterben der Algenkulturen bzw. zur Selektion auf Transformanten mit einer unvollständigen Integration des Cre-Rekombinasegens oder zur Stilllegung des Gens infolge von Silencing-Mechanismen. Da derzeit noch kein induzierbarer Promotor für *C. reinhardtii* zur Verfügung steht, der die für das *ccre*-Gen notwendige stringente Kontrolle der Genexpression zulässt, wurde die Strategie der „Cre-Selbsteliminierung“ („CSE“) zur kurzzeitigen Expression in *C. reinhardtii* gewählt. Das Prinzip ist bereits erfolgreich in Säugerzellen angewendet worden (92, 98, 152). Damit die Cre-Rekombinase ihre für sich selbst kodierende Gensequenz herauschneidet und somit ihre eigene Expression stilllegt, wurde das *ccre*-Gen zwischen zwei identische *lox*-Sequenzen gleicher Orientierung integriert. Die Expressionskassette entspricht im Wesentlichen dem *lox*-Expressionsvektor pCR-2loxP-APH (siehe 3.1.2). Das *ble-crluc*-Fusionsgen wurde durch die *ccre*-Sequenz ersetzt. Das promotorlose inaktive *aphVIII*-Gen, welches sich weiterhin direkt hinter dem *ccre*-Gen mit der zweiten *lox*-Sequenz befand, blieb zur Überprüfung auf die durch die Cre-Rekombinase vermittelte ortsgerichtete Rekombination erhalten: die Aktivierung des *aphVIII*-Gens durch die Lokalisierung direkt „downstream“ des HSP-R-In-Tandempromotors führt zur Expression des AphVIII-Proteins und ermöglicht so eine Selektion auf Paromomycin.

Von besonderer Bedeutung für eine erfolgreiche Integration des *ccre*-Gens in die *lox*-Expressionskassette war die Insertion von Intronsequenzen. Der Versuch das *ccre*-Gen ohne solche zusätzlichen Introns zwischen zwei identischen *lox*-Sequenzen zu integrieren und in *E. coli* stabil zu vermehren, konnte unter der Kontrolle des HSP-R-In-Tandempromotors nicht realisiert werden (nicht gezeigt). Dieses Ergebnis zeigte, dass dieser synthetische Promotor für *C. reinhardtii* eine schwache Promotoraktivität in *E. coli* besitzt. Diese Aktivität des HSP-R-In-Tandempromotors in *E. coli* wurde zusätzlich mit dem Plasmid pXX359, welches für ein codonoptimiertes *Gaussia*-Luciferasegen unter Kontrolle des HSP-R-In-Promotors kodiert, überprüft. Mit Hilfe der Lumineszenzmessung konnte eine schwache Expression der Luciferase nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Die *Gaussia*-Luciferase weist im Vergleich zu *Renilla*-Luciferase eine höhere Empfindlichkeit auf und ermöglicht somit die Detektion sehr geringer Expressionsmengen (persönliche Mitteilung Dr. Markus Heitzer, Manuskript in Bearbeitung).

Mit der Integration der beiden Introns des *RBCS2*-Gens in die *ccre*-Sequenz (siehe Abb. 3.8-a) konnte eine stabile Vermehrung des Plasmids pCR-cCrexInloxP-Aph in *E. coli* erreicht werden. Zur Abschätzung der Menge an „falschpositiven“ Transformanten, welche durch ungerichtete Integration des *aphVIII*-Gens hinter einen endogenen *C. reinhardtii*-Promotor eine Paromomyzinresistenz erlangen („promotor trapping“), wurde das *ccre*\*-Gen mit der inaktivierenden Punktmutation aus 3.7.1 ohne Introns in die *lox*-Kassette integriert. Die Integration zwischen die identischen *loxP*-Sequenzen erfolgte problemlos. Da die Vermehrung dieses Kontrollplasmids in *E. coli* erfolgreich war, konnte von einer vollständigen Inaktivierung der Rekombinaseaktivität ausgegangen werden.



**Abb. 3.8-a** „Cre-Selbsteliminierungs“-Vektor („CSE“-Vektor = pCR-cCrexInloxP-Aph) für die Überprüfung der Cre-Rekombinaseaktivität in *C. reinhardtii* sowie der Kontrollvektor pCR-cCre\*loxP-Aph.

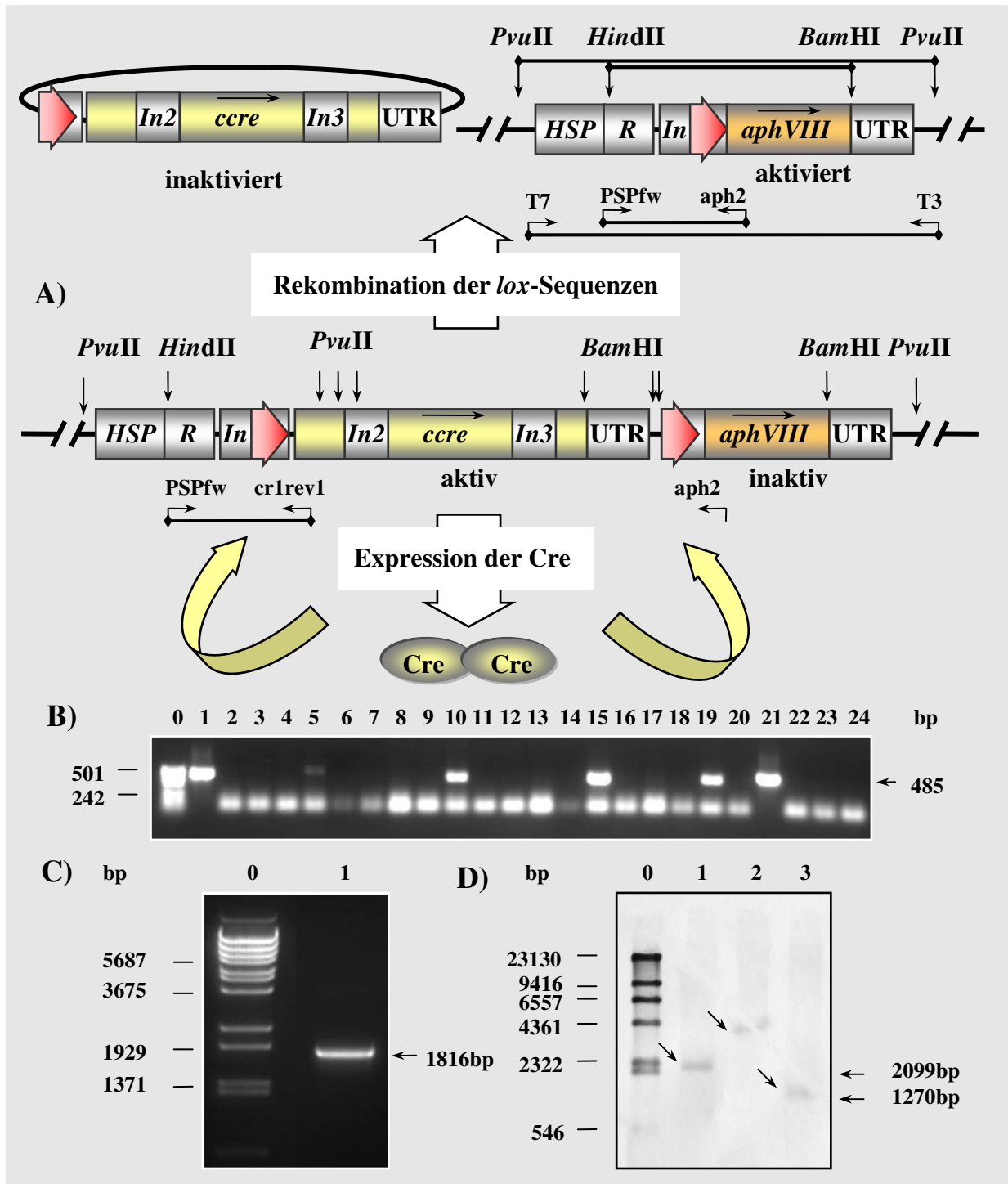
Die Transformation des „CSE“-Vektors pCR-cCrexInloxP-Aph und des Kontrollplasmids pCR-cCre\*loxP-Aph erfolgten im Stamm *cw15*<sup>+</sup>, die Selektion wurde auf Paromomyzin (20µg/ml) durchgeführt. Nach 6-8 Tagen konnten für beide Vektoren paromomyzinresistente Transformanten gewonnen werden. Die Anzahl der Transformanten lag für *cw15*<sup>+</sup>-cCrexInloxP-Aph und -cCre\*loxP-Aph im selben Größenbereich. Es wurden jeweils 48 Transformanten für jedes Konstrukt zur weiteren Analyse in TAP-Flüssigkultur mit Paromomyzin (10µg/ml) zur Erhöhung des Selektionsdruckes kultiviert (siehe Tab. 3.8-a).

Transformanten	Paromomyzinresistenz in Flüssigkultur [10µg/ml]	PCR1: 485bp PSPfw/aph2	PCR2: 322bp PSPfw/cr1rev1
<i>cw15</i> <sup>+</sup> -			
cCrexInloxP-Aph	19/48	4/19, positiv	3/4, positiv
cCre*loxP-Aph	3/48	0/3, positiv	0/3, positiv

**Tab. 3.8-a** Analyse von *cw15*<sup>+</sup>-cCrexInloxP-Aph und -cCre\*loxP-Aph-Transformanten.

Von 48 der untersuchten *cw15<sup>+</sup>-cCreInloxP-Aph*-Transformanten konnten nur 19 Algenkulturen unter Selektionsdruck weiter kultiviert werden. Diese Transformanten wurden mit einer PCR-Reaktion (Oligonukleotide: PSPfw und aph2) über den rekombinierten Bereich vom 5'-Ende des *RBCS2*-Promotors bis zum 5'-Ende des *aphVIII*-Gens untersucht (siehe Abb. 3.8-b Teil A). Unter der Voraussetzung, dass das *cCreIn*-Gen zwischen den *loxP*-Sequenzen eliminiert wurde, sollte ein 485bp großes PCR-Produkt amplifiziert werden. Das nichtrekombinierte Ausgangskonstrukt ergäbe ein 2559bp großes PCR-Produkt. Für vier der 19 untersuchten Algenkulturen konnte eine Platzierung des *aphVIII*-Gens hinter dem HSP-R-In-Promotor nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.8-b Teil B). Diese Transformanten wurden bezüglich der ursprünglichen Position des *cCreIn*-Gens zum Promotor mit einer zweiten PCR untersucht (Oligonukleotide: PSPfw und cr1rev1). Für drei der vier Transformanten war auch diese PCR positiv (nicht gezeigt), was auf eine Mehrfachinsertion des Plasmids pCR-cCreInloxP-Aph und eine unvollständige Rekombination durch die Cre-Rekombinase schließen lässt. Die vierte Transformante (Nr. 4), die dem Rekombinationsereignis zu entsprechen schien, wurde weiter mit einer dritten PCR (Oligonukleotide: T7 und T3) über die gesamte rekombinierte *lox*-Expressionskassette untersucht (Abb. 3.8-b Teil C). Das PCR-Produkt mit der korrekten Größe von 1816bp wurde anschließend in einen pGEM-T-Vektor integriert und sequenziert. Die Analyse der DNA-Sequenz bestätigte die korrekte ortsgerichtete Rekombination der *loxP*-Sequenzen. Die Genexpression des dazwischen liegenden *cCreIn*-Gens führte also zur Expression der Cre-Rekombinase und zur Selbsteliminierung der eigenen kodierenden Sequenz. Mit einer *aphVIII*-Sonde (wie bereits in Abb. 3.1-g dargestellt) wurde zusätzlich im Southern Blot die genomische DNA der *cw15<sup>+</sup>-cCreInloxP-Aph*-Transformante Nr. 4 auf die entstandene *aphVIII*-Expressionskassette untersucht. Nur bei einer erfolgreichen Rekombination entsteht bei einem *PvuII*-Restriktionsverdau das 2099bp große Fragment bedingt durch die zwei verbleibenden *PvuII*-Schnittstellen. Des Weiteren konnte das erwartete 1270bp große *HindIII/BamHI*-Fragment nachgewiesen werden. Der *HindIII*-Einzelverdau bestätigte zudem die Einfachinsertion der *lox*-Expressionskassette, da nur eine Bande bei ca. 4000bp zu erkennen ist (siehe Abb. 3.8-b Teil D).

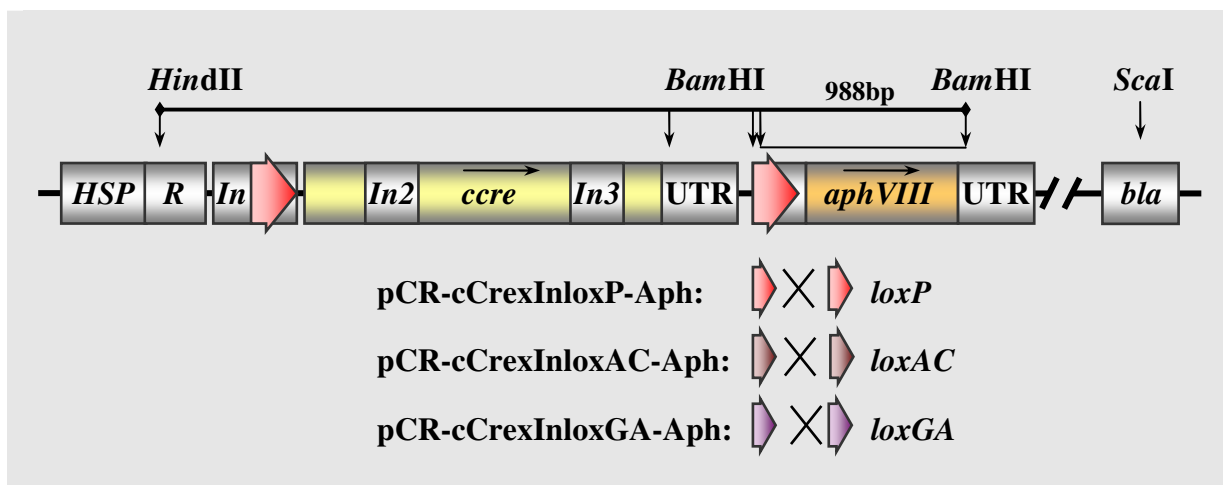
Die Überprüfung der *cw15<sup>+</sup>-cCre\*loxP-Aph*-Transformanten mit der eingeführten Punktmutation in der *cCre*-Sequenz ergab für keine der PCR-Reaktionen positive Ergebnisse. Die Paromomycinresistenz muss infolge einer ungerichteten Integration des *aphVIII*-Gens hinter einem chromosomalen *C. reinhardtii*-Promotor und der daraus resultierenden Genexpression entstanden sein (153).



**Abb. 3.8-b** A) „Cre-Selbsteliminierungs“-Strategie in *C. reinhardtii*. B) Detektion von paromycinresistenten *cw15<sup>+</sup>*-cCreInloxP-Aph- und -cCre\*loxP-Aph-Transformanten mit Hilfe der genomische PCR (Oligonukleotide: PSPfw und aph2, 485bp): Spur 0) DNA-Molekulargewichtsstandard, 1) Plasmidkontrolle pSI105 (448bp ohne *loxP*), 2-20) *cw15<sup>+</sup>*-cCreInloxP-Aph Nr. 1-19, Spur 21) Plasmidkontrolle pSI105, 22-24) *cw15<sup>+</sup>*-cCre\*loxP-Aph Nr. 1-3. C) Genomische PCR für *cw15<sup>+</sup>*-cCreInloxP-Aph-Transformante Nr. 4 mit den Oligonukleotiden T7 und T3: Spur 0) DNA-Molekulargewichtsstandard, 1) Transformante Nr. 4. D) Southern Blot-Analyse von Transformante Nr. 4 mit einer *aphVIII*-Sonde: Spur 0) DIG-gelabelter DNA-Molekulargewichtsstandard, 1) *PvuII*-Restriktionsverdau, 2) *HindIII*-Restriktionsverdau und 3) *HindIII/BamHI*-Restriktionsverdau der genomischen DNA.

### „Cre-Selbsteliminierungs“-Vektoren mit mutierten *lox*-Sequenzen

Für die „CSE“-Vektoren wurden neben der wildtypischen *loxP*-Sequenz auch die mutierten *lox*-Sequenzen *loxGA* und *loxAC* überprüft (siehe Abb. 3.8-c).



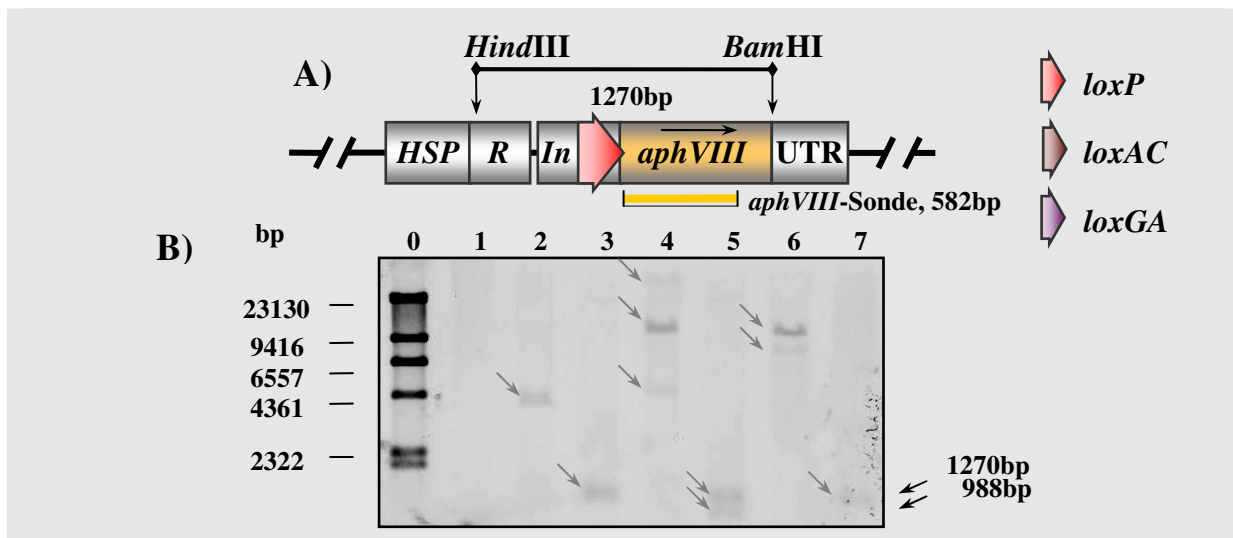
**Abb. 3.8-c** „CSE“-Vektoren mit verschiedenen *lox*-Sequenzen für die Überprüfung der Cre-Rekombinaseaktivität in *C. reinhardtii*.

Die Transformation der *lox*-Vektoren pCR-cCrexInloxGA-Aph und pCR-cCrexInloxAC-Aph erfolgte wiederum im Stamm *cw15<sup>+</sup>*. Genau wie für den *loxP*-Vektor konnten nach 6-8 Tagen für beide Vektoren paromomyzinresistente Transformanten selektiert werden, wobei bei gleicher DNA-Menge die Anzahl der Transformanten mit der *loxGA*-Sequenz doppelt so hoch war. Es wurden jeweils 48 *cw15<sup>+</sup>*-cCrexInloxGA-Aph und -cCrexInloxAC-Aph-Transformanten zur weiteren Analyse in TAP-Flüssigmedium mit 10µg/ml Paromomyzin kultiviert. Die Transformanten wurden zuerst mit einer PCR-Reaktion (wie unter 3.8 beschrieben, Oligonukleotide: PSPfw und cr1rev1, nicht gezeigt) auf eine fehlende Verknüpfung des 5'-Ende des *ccreIn*-Gens mit dem 5'-Ende des HSP-R-In-Promotors untersucht. Mit einer zweiten PCR-Reaktion (Oligonukleotide: PSPfw und aph2, nicht gezeigt) wurden dann die Transformanten, welche in der ersten PCR-Reaktion ein negatives Ergebnis aufwiesen, auf die mögliche neue Lokalisierung des *aphVIII*-Gens hinter dem Promotor als Resultat einer Rekombination untersucht (siehe Tab. 3.8-b).

Transformanten	TAP-Flüssigkultur mit	PCR2: 322bp	PCR1: 485bp
<i>cw15<sup>+</sup></i> -	Paromomyzin [10µg/ml]	PSPfw/cr1rev1	PSPfw/aph2
cCrexInloxGA-Aph	42/48	13/42, negativ	8/13, positiv
cCrexInloxAC-Aph	42/48	16/42, negativ	7/16, positiv

**Tab. 3.8-b** Analyse von *cw15<sup>+</sup>*-cCrexInloxGA-Aph und -cCrexInloxAC-Aph-Transformanten.

Unter diesen Selektionsbedingungen konnten für 42 paromomyzinresistenten *cw15<sup>+</sup>*-*cCrexInloxGA*-Aph-Transformanten acht Kulturen identifiziert werden, welche bezüglich der Lokalisation des *ccreIn*-Gens negativ und eines aktivierten *aphVIII*-Gens positiv waren. Für die 42 paromomyzinresistenten *cw15<sup>+</sup>*-*cCrexInloxAC*-Aph-Transformanten konnten unter denselben Bedingungen sieben Algenklone selektiert werden. Für jeweils eine der positiven Transformanten mit *loxGA* (Nr. 9) bzw. *loxAC* (Nr. 3) wurde das PCR-Produkt über die rekombinierte *lox*-Sequenz sequenziert und eine korrekte Rekombination bestätigt. Abschließend wurden die Transformante *cw15<sup>+</sup>*-*cCrexInloxP*-Aph Nr. 4 (als Kontrolle, siehe 3.8), -*cCrexInloxGA*-Aph Nr. 9 und -*cCrexInloxAC*-Aph Nr. 3 im direkten Vergleich mit einer *aphVIII*-Sonde im Southern Blot untersucht. Zur Ermittlung der Kopienzahl der Expressionskassette wurde die genomische DNA wieder mit dem Restriktionsenzym *HindIII* und zur Untersuchung auf die erfolgte Eliminierung des *ccreIn*-Gens mit dem Doppelverdau *HindIII*/*BamHI* verdaut. Für die *cw15<sup>+</sup>*-*cCrexInloxGA*-Aph-Transformanten Nr. 9 ergab der *HindIII*-Verdau eine Mehrfachinsertion. In der Abb. 3.8-d Teil B sind in Spur 4 drei Banden zu sehen. Die größte Bande liegt dabei über 23000bp (möglicherweise unverdaute DNA), die zweite bei ca. 10000bp und die dritte bei 4500bp. Der *HindIII*/*BamHI*-Verdau ergab die erwartete Bande bei 1270bp nach Eliminierung des *ccreIn*-Gens. Zusätzlich ist noch eine Bande bei 988bp zu sehen, diese resultiert aus der nichtrekombinierten Expressionskassette (*BamHI*/*BamHI*-Verdau, siehe Abb. 3.8-c). Bei der *cw15<sup>+</sup>*-*cCrexInloxAC*-Aph-Transformante Nr. 3 liegt ebenfalls eine Doppelinsertion vor (siehe Spur 6 bei ca. 8000 und 9000bp), der *HindIII*/*BamHI*-Verdau ergab nur die erwartete Bande bei 1270bp, siehe Spur 7.

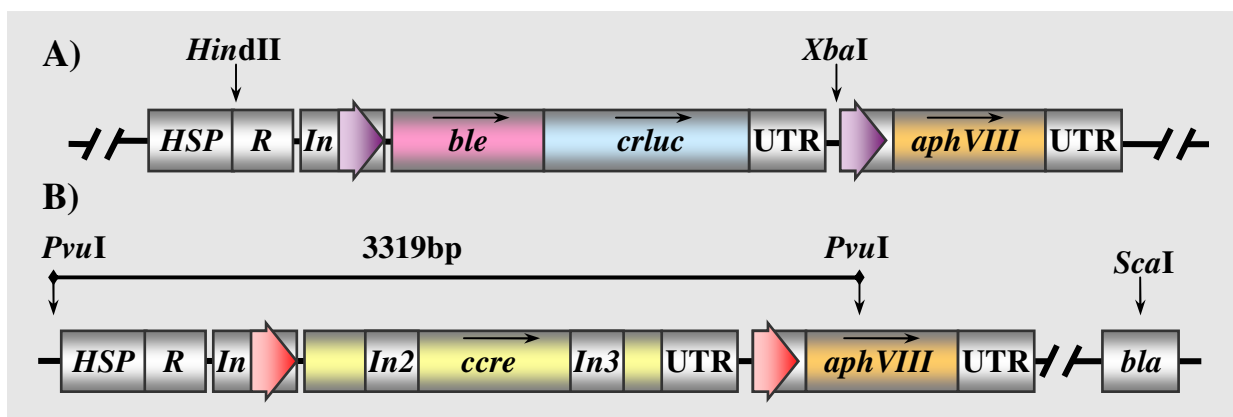


**Abb. 3.8-d A)** *aphVIII*-Expressionskassette der „Cre-Selbsteliminierung“-Vektoren mit den *lox*-Sequenzen *loxP*, *loxGA* und *loxAC* nach erfolgreicher Rekombination im Stamm-*cw15<sup>+</sup>*. **B)** Southern Blot-Analyse mit einer *aphVIII*-Sonde: Spur 0) DIG-gelabelter DNA-Molekulargewichtsstandard. 1) untransformierter *cw15<sup>+</sup>* als Kontrolle, 2) und 3) *HindIII*-Verdau und *HindIII*/*BamHI*-Verdau von *cw15<sup>+</sup>*-*cCrexInloxP*-Aph (*loxP*, Nr.4), 4) und 5) *HindIII*-Verdau und *HindIII*/*BamHI*-Verdau von *cw15<sup>+</sup>*-*cCrexInloxGA*-Aph (*loxGA*, Nr. 9), 6) und 7) *HindIII*-Verdau und *HindIII*/*BamHI*-Verdau von *cw15<sup>+</sup>*-*cCrexInloxAC*-Aph (*loxAC*, Nr.3).

Somit konnte für jeden der *lox*-Expressionsvektoren mit der *loxP*-, *loxAC*- oder *loxGA*-Sequenz die kurzzeitige Expression einer funktionellen Cre-Rekombinase nachgewiesen werden, welche die *lox*-Sequenzen erkennt und deren Rekombination in *Chlamydomonas reinhardtii* durchführt. Mit Hilfe des „Cre-Selbsteliminierungs“-Vektor konnte nur das Endergebnis der ortsgerichteten Rekombination also die Aktivierung des *aphVIII*-Gens bzw. die Eliminierung des *ccreIn*-Gens untersucht werden, eine Aussage zum Zeitpunkt der erfolgten Rekombination war nicht möglich. Die Rekombination könnte sowohl vor als auch nach der Integration des „CSE“-Vektors in das *C. reinhardtii*-Genom stattgefunden haben.

### 3.9 *In vivo* Rekombinationsassay in *C. reinhardtii*

Da mit dem „CSE“-Vektor eine Möglichkeit für die kurzzeitige Cre-Expression in *C. reinhardtii* geschaffen wurde, sollte nun mit dem *in vivo* Rekombinationsassay die Rekombination von bereits integrierten *lox*-Sequenzen im *C. reinhardtii*-Genom überprüft werden. Dafür wurden die *lox*-Transformanten *cw15Arg<sup>-</sup>A-2loxP-APH*, *-2loxGA-APH* und *-2loxAC-APH* (siehe Abb. 3.1-g) als Rezipienten mit dem „CSE“-Vektor transformiert. Die *lox*-Transformanten als auch die „CSE“-Vektoren basieren auf dem gleichen Prinzip der *lox*-Insert-*lox*-Expressionskassette, wie in Abb. 3.9-a Teil A und B zu erkennen ist. Da die Selektion der Transformanten nach erfolgreicher Rekombination auf der Aktivierung des *aphVIII*-Gens bzw. der daraus resultierenden Paromomyzinresistenz beruht, musste vom ursprünglichen „CSE“-Vektor das *aphVIII*-Gen entfernt werden. Dafür wurde der Vektor vor der Transformation mit dem Restriktionsenzym *PvuI* geschnitten (siehe Abb. 3.9-a Teil B), wodurch eine 3319bp große *lox-ccreIn-lox*-Expressionskassette mit einem am 3'-Ende stark verkürzten inaktiven *aphVIII*-Gen entstand. Die verbleibenden 384bp vom 5'-Ende des *aphVIII*-Gens genügen nicht, um nach der Selbsteliminierung des *ccreIn*-Gens eine Resistenz gegen Paromomyzin zu vermitteln.



**Abb. 3.9-a *In vivo* Rekombinationsassay in *C. reinhardtii*.** A) *cw15Arg<sup>-</sup>A-2loxGA-APH*-Rezipient mit *loxGA-ble-crluc-loxGA*-Expressionskassette. B) „CSE“-Vektor *pCR-cCrexInloxP-APH* mit *loxP-ccreIn-loxP*-Expressionskassette.

Für die ortsgerichtete Rekombination der vorhandenen *lox*-Sequenzen im *C. reinhardtii*-Genom wurden die *lox*-Transformanten *cw15Arg<sup>-</sup>A*-2loxP-APH, -2loxGA-APH und -2loxAC-APH sowie die Kontrolle *cw15Arg<sup>-</sup>A* mit dem *PvuI* geschnitten pCR-cCrexInloxP-APH-Fragment transformiert. Die Selektion positiver Transformanten erfolgte auf Paromomycin (20µg/ml). Nur für die Kultur *cw15Arg<sup>-</sup>A*-2loxGA-APH konnten nach acht Tagen paromomycinresistente Einzelkolonien erhalten werden. Von den 171 paromomycinresistenten Transformanten wurden 96 für die weitere Analyse des Phäno- und Genotyps in Flüssigkultur gezüchtet (siehe Tab. 3.9-a). Der erwartete Phänotyp - zeozinsensitiv, luciferasenegativ und paromomycinresistent - konnte für keine der 96 untersuchten *cw15Arg<sup>-</sup>A*-2loxGA-APH/CSE-Transformanten eindeutig identifiziert werden.

<b><i>lox</i>-Transformanten</b>	<b>Zeozin - sensitivität [5µg/ml]</b>	<b>Luciferase- aktivität</b>	<b>Paromomycin- resistenz [20µg/ml]</b>	<b>Phänotyp: Ble<sup>-</sup>/rLuc<sup>-</sup>/ AphVIII<sup>+</sup></b>
<b>2loxGA-APH/CSE</b>	46/96	85/96	53/96	8/96

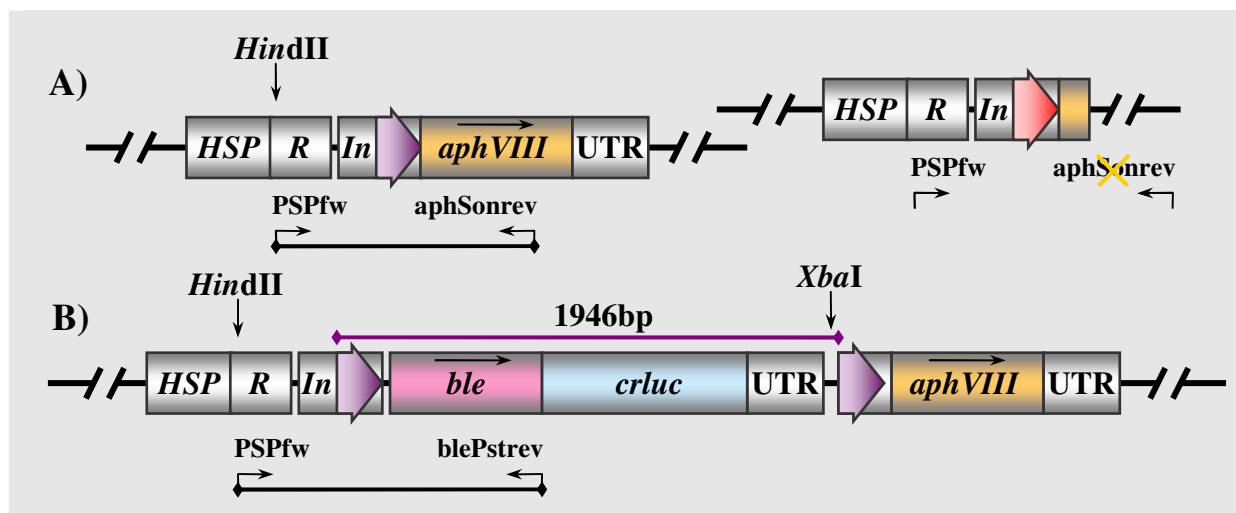
**Tab. 3.9-a Untersuchung der *lox*-Transformanten *cw15Arg<sup>-</sup>A*-2loxGA-APH/CSE** nach einer möglichen Rekombination.

Für acht der Transformanten konnte eine sehr niedrige Luciferaseaktivität, eine Sensitivität gegen Zeozin und eine Resistenz gegen Paromomycin nachgewiesen werden. Die 88 verbliebenen Algenkulturen zeigten sowohl den erwarteten Phänotyp des Ausgangsstammes als auch den Phänotyp nach erfolgter Rekombination, d.h. sie waren sowohl zeozinresistent und luciferaseaktiv als auch paromomycinresistent. Ein weiteres Problem ergab sich bei der fortlaufenden Kultivierung des untransformierten Ausgangsstammes *cw15Arg<sup>-</sup>A*-2loxGA-APH. Die Kultur zeigte nach einigen Wochen nicht mehr den erwarteten Phänotyp (zeozinresistent mit aktiver Luciferase). Dies machte sowohl die Analyse des Rezipientenstammes *cw15Arg<sup>-</sup>A*-2loxGA-APH als Kontrolle als auch die möglicher rekombinierter Transformanten schwierig. Wie sich herausstellte, enthielt der Rezipient zwei Kopien der *ble-crluc*-Expressionskassette (siehe Southern Blot Abb. 3.1-g), was möglicherweise zu einer Genstilllegung beider *ble-crluc*-Fusionsgene geführt haben könnte und somit zum Verlust der Zeozinresistenz und der Luciferaseaktivität im Laufe der Kultivierung.

Die Untersuchung des Genotyps der Transformanten mit einer PCR-Reaktion bestätigte den gemischten Phänotypen der *cw15Arg<sup>-</sup>A*-2loxGA-APH/CSE-Transformanten. Zum einen konnte die Rekombination der bereits integrierten *loxGA-ble-crluc-loxGA*-



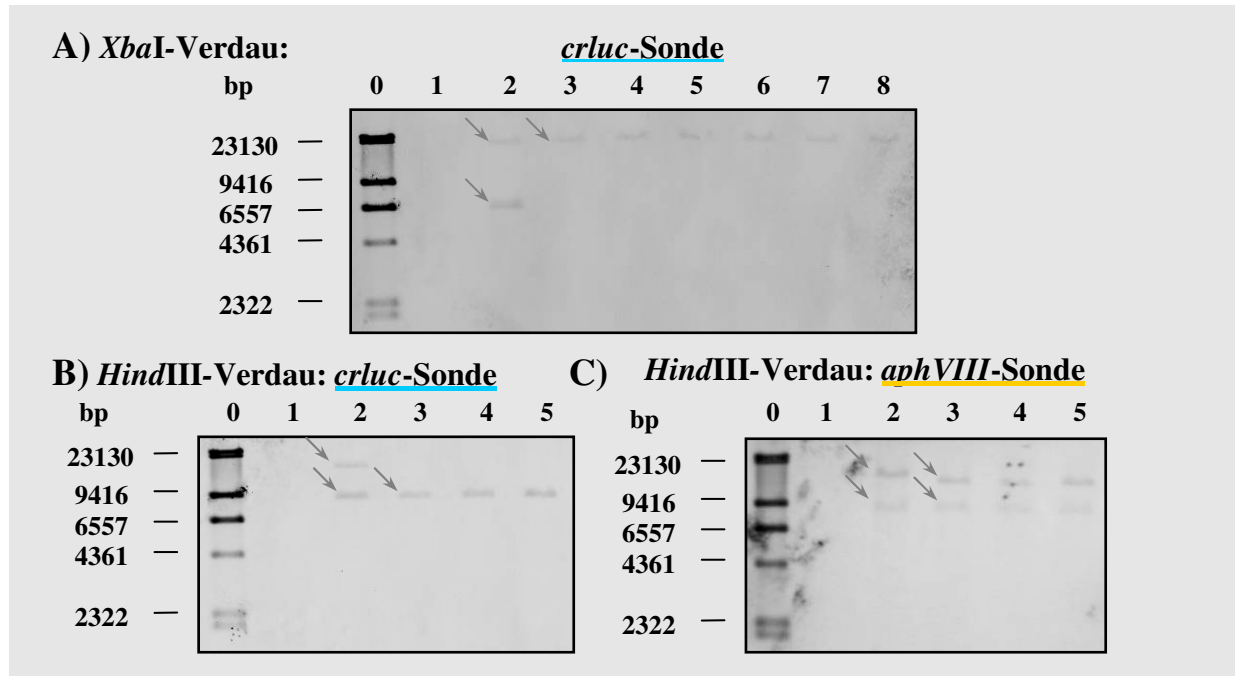
Expressionskassette in den untersuchten Algenkulturen mit der PCR-Reaktion (Oligonukleotide: PSPfw und aphSonrev, 774bp, nicht gezeigt) für 53 von 96 Transformanten nachgewiesen werden, (aphSonrev bindet nicht auf dem verkürzten *aphVIII*-Gen des „CSE“-Vektors, siehe Abb. 3.9-b). Zum anderen konnte mit der Kontroll-PCR (Oligonukleotide: PSPfw und blePstrev, 816bp, nicht dargestellt) über den nichtrekombinierten Bereich vom 5'-Ende des Promotor bis zum 3'-Ende des *ble*-Gens für diese Transformanten eine zusätzliche nichtrekombinierte Kopie der *lox*-Expressionskassette nachgewiesen werden (nicht gezeigt).



**Abb. 3.9-b Untersuchung des Genotypes der *cw15ArgA-2loxGA-APH/CSE*-Transformanten** mittels PCR-Reaktion über den Bereich der *lox*-Sequenzen. A) *lox*-Expressionskassette nach erfolgreicher Eliminierung des *ble-crluc*-Fusionsgens im Stamm *cw15ArgA-2loxGA-APH* sowie des „CSE“-Vektors nach der Selbsteliminierung des *ccreIn*-Gens. B) Ursprüngliche *lox*-Expressionskassette in *cw15ArgA-2loxGA-APH* ohne erfolgreiche Rekombination bzw. nichtfunktionelles Artefakt.

Des Weiteren wurde die Rekombination des Genlocus für die *cw15ArgA-2loxGA-APH/CSE*-Transformanten im Southern Blot untersucht. Dafür wurde die genomische DNA von sechs paromomyzinresistenten Algenkulturen isoliert und mit den Restriktionsenzymen *Xba*I und *Hind*III untersucht. Das Enzym *Xba*I hat eine Erkennungssequenz zwischen der 3'-UTR des *ble-crluc*-Gens und der folgenden *loxGA*-Sequenz (siehe Abb. 3.9-b). Nach der Eliminierung der *lox-ble-crluc-lox*-Kassette ist die Schnittstelle nicht mehr präsent. Das Enzym schneidet dann nur spezifisch im Genom. *Hind*III schneidet am 5'-Ende des *RBCS2*-Promotors sowohl in der nichtrekombinierten Ausgangskassette als auch in der rekombinierten Kassette. Die aus den Verdauen resultierenden DNA-Fragmente wurden nach der gelektrophoretischen Auftrennung mit einer spezifischen *crluc*-Sonde untersucht. Wie in Abb. 3.9-c Teil A zu erkennen ist, wurde eine der zwei *loxGA-ble-crluc-loxGA*-Expressionskassetten aus dem Ausgangsstamm *cw15ArgA-2loxGA-APH* bei ca. 6500bp (Spur 2) erfolgreich durch die Cre-Rekombinase aus dem Genom eliminiert. Da, wie in Spur 3-8 zu sehen ist, diese Bande für die *cw15ArgA-2loxGA-APH*-Transformanten 2, 10, 12, 32, 49 und 65 mit der *crluc*-Sonde

nicht mehr detektiert werden konnte. Die zweite *ble-crluc*-Expressionskassette bei ca. 23000bp (Spur 2) bleibt auch in den rekombinierten Transformanten erhalten (Spur 3-8). Da bei allen sechs Algenkulturen das Bandenmuster identisch ist, scheint diese Expressionskassette nichtfunktionell zu sein. Mit dem *HindIII*-Verdau konnten ebenfalls zwei Banden bei ca. 20000bp und ca. 9000bp für den Ausgangsstamm *cw15Arg<sup>+</sup>A-2loxGA-APH* detektiert werden (siehe Abb. 3.9-c Teil B) Spur 2). Das *HindIII*-Fragment bei ca. 20000bp konnte für die rekombinierten Transformanten infolge der Eliminierung durch die Cre-Rekombinase nicht mehr mit der *crluc*-Sonde detektiert werden. Das zweite Fragment bei ca. 9000bp bleibt dagegen weiter erhalten (Spur 3-5, für Nr. 2, 10 und 12 dargestellt). Parallel wurden die *HindIII*-Verdaue noch mit einer *aphVIII*-Sonde detektiert. Da das *aphVIII*-Gen sowohl vor als auch nach der erfolgten Rekombination der *lox*-Sequenzen im Genom an derselben Stelle integriert sein sollte, wird für die rekombinierte *lox-ble-crluc-lox*-Expressionkassette eine Verkleinerung um 1946bp erwartet. In Abb. 3.9-c Teil C ist zu erkennen, dass das *HindIII*-Fragment bei ca. 20000bp (Spur 2) für die rekombinierten Transformanten Nr. 2, 10 und 65 (Spur 3-5) kleiner ist. Das zweite *HindIII*-Fragment bleibt bei ca. 9000bp (Spur 2), wie schon bei der Detektion mit der *crluc*-Sonde beobachtet, für die rekombinierten Transformanten (Spur 3-5) unverändert.



**Abb. 3.9-c Southern Blot-Analyse der *cw15Arg<sup>+</sup>A-2loxGA-APH/CSE*-Transformanten.** A) Detektion des *XbaI*-Restriktionsverdaus mit *crluc*-Sonde: Spur 0) DIG-gelabelter DNA-Molekulargewichtsstandard, 1) Negativkontrolle *cw15Arg<sup>+</sup>A*, 2) Ausgangsstamm *cw15Arg<sup>+</sup>A-2loxGA-APH*, 3-8) *cw15Arg<sup>+</sup>A-2loxGA-APH/CSE*-Transformanten Nr. 2, 10, 12, 32, 49 und 65. B) Detektion des *HindIII*-Restriktionsverdaus mit der *crluc*-Sonde: Spur 0) DIG-gelabelter DNA-Molekulargewichtsstandard, 1) *cw15Arg<sup>+</sup>A*, 2) *cw15Arg<sup>+</sup>A-2loxGA-APH*, 3-5) *cw15Arg<sup>+</sup>A-2loxGA-APH/CSE*-Transformanten Nr. 2, 10 und 12. C) Detektion des *HindIII*-Restriktionsverdaus mit der *aphVIII*-Sonde: Spur 0) DIG-gelabelter DNA-Molekulargewichtsstandard, 1) *cw15Arg<sup>+</sup>A*, 2) *cw15Arg<sup>+</sup>A-2loxGA-APH*, 3-5) *cw15Arg<sup>+</sup>A-2loxGA-APH/CSE*-Transformanten Nr. 2, 10 und 12.

Damit konnte eindeutig gezeigt werden, dass eine bereits in das *C. reinhardtii*-Genom integrierte *lox*-Expressionskassette von der Cre-Rekombinase erkannt und rekombiniert werden kann. Das Enzym ist somit in der Lage unabhängige Rekombinationsereignisse an verschiedenen Orten im *C. reinhardtii*-Genom spezifisch zu katalysieren. Des Weiteren kann der „Cre-Selbsteliminierungs“-Vektor zur kurzzeitigen Expression der Cre-Rekombinase in *C. reinhardtii* verwendet werden. Da für die Transformanten *cw15Arg<sup>-</sup>A-2loxPAPH* und *cw15Arg<sup>-</sup>A-2loxAC-APH* nach der Integration des „CSE“-Vektors keine paromomycinresistenten Transformanten erhalten wurden, scheint auch hier eine nichtfunktionelle *lox*-Expressionskassette vorzuliegen, was auch das Fehlen der Banden mit der *crluc*- und der *aphVIII*-Sonde im *Xba*I-Verdau (siehe Abb. 3.1-g Teil C) erklären würde.

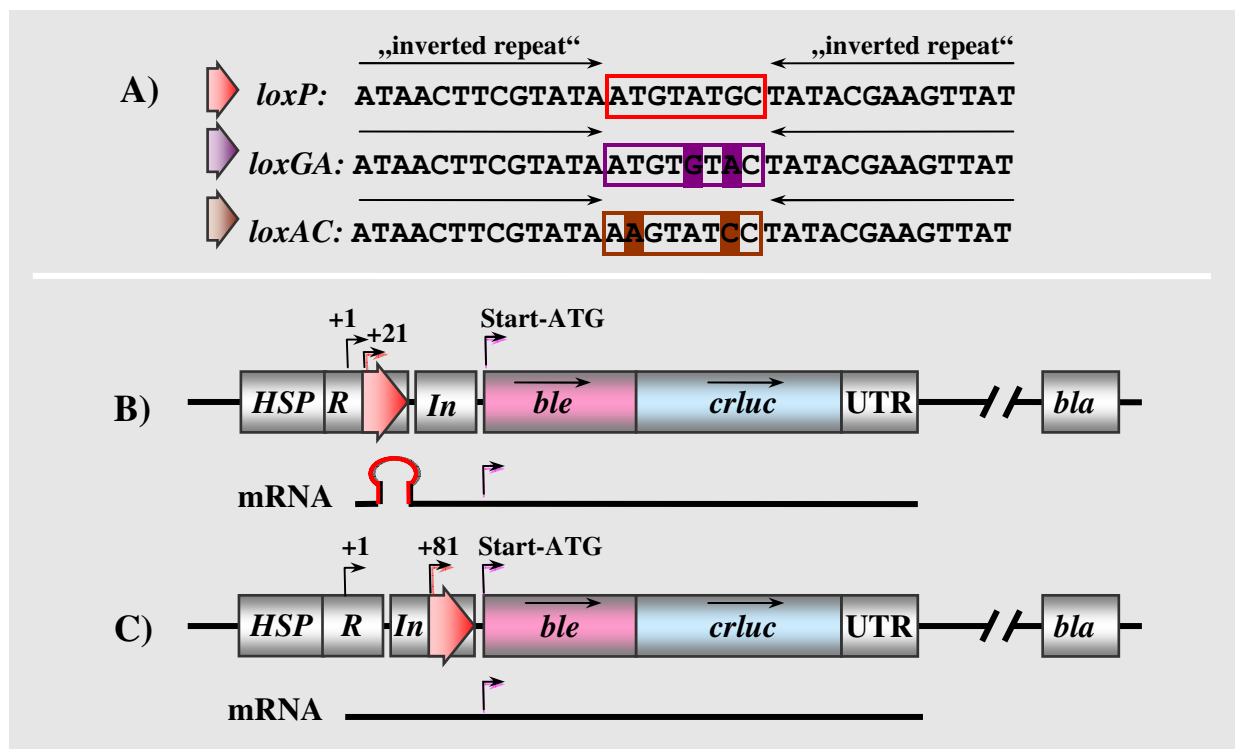
## 4 DISKUSSION

Für die Etablierung eines Cre/*lox*-Rekombinationssystems in *C. reinhardtii* musste zunächst ein *lox*-Rezipientenstamm generiert werden, welche die Überprüfung der Cre-Rekombinaseaktivität zulässt. Des Weiteren wurde im Rahmen dieser Arbeit nach einer geeigneten Methode gesucht, die funktionelle Cre-Rekombinase zur Vermittlung der ortsgerichteten Rekombination im Zellkern der Algen bereitzustellen.

### 4.1 Generierung von *lox*-Rezipienten in *C. reinhardtii*

#### Integration der *lox*-Sequenz in die Expressionskassette

Für die Generierung einer *lox*-Erkennungsequenz im *C. reinhardtii*-Genom wurden verschiedene Positionen in der nichtkodierenden Sequenz des *RBCS2*-Gens als Ort für die Insertion der *lox*-Sequenz getestet. Neben der Wildtypsequenz *loxP* wurden parallel die mutierten *lox*-Sequenzen *loxGA* und *loxAC* untersucht (siehe Abb. 4.1-a). Zum einen wurde die *lox*-Sequenz in die 5'-UTR und zum anderen im Intron1 des *RBCS2*-Gens integriert.



**Abb. 4.1-a Integration der *lox*-Sequenz** in der nichtkodierenden Sequenz des *RBCS2*-Gens. A) Wildtypsequenz *loxP* sowie mutierte *lox*-Sequenzen *loxGA* und *loxAC* (Basensubstitutionen sind farblich hinterlegt). B) Expressionskassette dargestellt für *loxP*-Sequenz an Position +21 „downstream“ vom Transkriptionsstart (+1) des *RBCS2*-Promotors. Darunter ist die mögliche „stem-loop“-Struktur in der mRNA dargestellt. C) *loxP*-Sequenz bei Position +81 „downstream“ vom Transkriptionsstart (+1) im *RBCS2*-Intron1. Darunter ist die resultierende mRNA ohne „stem-loop“-Struktur abgebildet. HSP-R-In = *HSP70A/RBCS2*-Tandempromotor mit Intron1, UTR = 3'-UTR des *RBCS2*-Gens, *bla* = Ampicillinresistenzgen, *ble-crluc* = *ble*-codonoptimiertes Luciferase-Fusionsgen.

Der mögliche Einfluss der *lox*-Sequenz auf die Genexpression wurde mit Hilfe des Fusionsgens *ble-crluc* überprüft. Als Kontrolle diente eine identische Expressionskassette ohne *lox*-Erkennungssequenz. Im Vergleich zum Kontrollvektor, der wie erwartet das Ble-rLuc-Fusionsprotein korrekt exprimierte und Zeozinresistenz sowie Luciferaseaktivität zeigte, konnten für die Plasmide mit der *lox*-Sequenz in der 5'-UTR des *RBCS2*-Gens keine zeozinresistenten Transformanten selektiert werden. Eine mögliche Ursache für die fehlende Expression des Fusionsgens *ble-crluc* könnte die Ausbildung einer „stem-loop“-Struktur infolge der „inverted repeat“-Sequenzen in der *lox*-Erkennungssequenz sein (siehe Abb. 4.1-a Teil B). Kozak hat gezeigt, dass Sekundärstrukturen in der 5'-UTR „upstream“ vom Translationsstart (Start-ATG) einen inhibierenden Einfluss auf die Initiation der Translation haben können (84). Liu et al. konnten durch die Einführung von Mutationen in die „inverted repeat“-Strukturen eine so genannte *loxH*-Sequenz generieren, welche im Vergleich zum Wildtyp *loxP* eine weniger stabile „stem-loop“-Struktur aufwies und so zu einer Verbesserung der Expression des Reportergens führte. Die Reduktion der Rekombinationseffizienz von über 75% schränkt aber die Verwendung dieser *loxH* als Erkennungssequenz deutlich ein (91).

Durch die Integration der *lox*-Sequenz in das Intron1 des *RBCS2*-Gens wird infolge des Spleißens die mögliche Sekundärstruktur eliminiert, und die Translation der mRNA kann somit ungehindert erfolgen (siehe Abb. 4.1-a Teil C). Es konnten für alle *lox*-Sequenzen (*loxP*, *loxGA*, *loxAC*) zeozinresistente Transformanten gewonnen werden. Aufgrund der korrekten Expression des Fusionsproteins Ble-rLuc wurde die *lox*-Erkennungssequenz für die Cre-Rekombinase in den folgenden Versuchen standardmäßig im Intron1 des HSP-R-In-Tandempromotors integriert.

### ***lox*-Rezipienten zur Überprüfung der Cre-Rekombinaseaktivität**

Um die Aktivität der Cre-Rekombinase in *C. reinhardtii* überprüfen zu können, wurde ein geeigneter Rekombinationsassay etabliert, welcher sowohl die Detektion des nichtrekombinierten Ausgangszustandes als auch die eines erfolgreichen Rekombinationsereignisses zuließ. Dafür wurde zusätzlich zu der *ble-crluc*-Kassette mit der *lox*-Sequenz im Intron1 ein zweiter Selektionsmarker eingeführt, das promotorlose *aphVIII*-Gen für die Resistenz gegen Paromomycin. Dieses zweite Resistenzgen wurde mit einer zweiten identischen *lox*-Sequenz in gleicher Orientierung und einem Teil des Intron1 „downstream“ der 3'-UTR der *ble-crluc*-Expressionskassette gesetzt. Die resultierenden *lox*-Expressionsvektoren pCR-2loxP-Aph, pCR-2loxGA-Aph und pCR-2loxAC-Aph wurden vor

ihrer Verwendung in *C. reinhardtii* erfolgreich sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in *E. coli* auf ihre Rekombinierbarkeit überprüft.

Für die Transformation des *Chlamydomonas*-Genoms zur Integration der *lox*-Vektoren wurde zu Beginn der Arbeit der Stamm *cw15Arg<sup>-</sup>A* verwendet, da dieser neben der Verwendung der Resistenzmarker (*ble*, *aphVIII*) auch den Auxotrophiemarker *ARG7.8* zur Selektion für Folge-Transformationen ermöglicht. Die Selektion auf Zeozin führte aber in diesem Stamm nur zu wenigen zeozinresistenten *lox*-Transformanten. Dieser Effekt konnte auch in späteren Versuchen bei weiteren Konstrukten mit dem *ble*-Gen als Selektionsmarker beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung für die niedrige Transformationseffizienz kann die mutagene Wirkung des Antibiotikums Zeozin sein, welches Doppelstrangbrüche in der DNA verursacht (121). Der zellwandlose und argininauxotrophe *cw15Arg<sup>-</sup>A*-Stamm weist möglicherweise zusätzliche Defekte im DNA-Reparaturmechanismus auf, was zu einer verringerten Toleranz gegenüber Zeozin führen würde. Es konnte aber je eine Transformante für die Integration der *loxP*-, *loxGA*- und *loxAC*-Expressionsvektoren mit Hilfe von PCR-Reaktionen und Southern Blot-Analysen identifiziert werden, welche nachfolgend zur Überprüfung der Cre-Rekombinaseaktivität verwendet wurden.

Die Wiederholung der Transformation im argininauxotrophen *Chlamydomonas*-Stamm *cw15<sup>+</sup>* führte dagegen zu einer deutlichen Erhöhung zeozinresistenter Transformanten und ermöglichte somit eine bessere Auswahl potentieller *lox*-Rezipienten. Trotz der höheren Anzahl an Transformanten konnten nur zwei *cw15<sup>+</sup>*-2loxP-APH-Klone gefunden werden, welche die Expressionskassette nur einmal und vollständig integriert aufwiesen und für die Cre-vermittelte Rekombination als Teststamm zur Verfügung standen. Bei allen weiteren bisher untersuchten Kulturen (mit *loxP*-, *loxGA*- bzw. *loxAC*-Expressionskassette) handelte es sich um Klone mit Mehrfachinsertionen, die eine spätere Analyse bezüglich ihrer Rekombination erschweren würden. Zudem hat sich gezeigt, dass Transformanten, die die Expressionskassette mehrfach enthalten, das Fusionsgen *ble-crluc* nach längerer Kultivierung ohne Selektionsdruck infolge von Silencingmechanismen stilllegen (17), und somit eine Analyse bezüglich des Phänotyps (Zeozinresistenz, Luciferaseaktivität, Paromomycinresistenz) unmöglich machen. Bis zum Ende der Arbeit konnten für die *loxAC*- und die *loxGA*-Erkennungssequenz keine geeigneten Teststämme generiert werden. Die anfängliche Analyse durch überlappende PCR-Reaktionen hat sich als nicht ausreichend herausgestellt. Die Untersuchung von weiteren möglichen Rezipienten ist in Bearbeitung.

## 4.2 Rekombinationsassay mit gereinigter Cre-Rekombinase

Für die Integration der Cre-Rekombinase als Protein, wurde das *cre*-Gen sowohl allein als auch als Fusionsprotein (Ble-Cre, Ble-L-Cre, GFP-L-Cre) in *E. coli* heterolog exprimiert. Die Rekombinaseaktivität konnte für alle *cre*-exprimierenden Vektoren *in vivo* nachgewiesen werden (siehe Tab. 4.2-a). Das bedeutet, dass die Fusion am N-Terminus der Cre-Rekombinase im Wesentlichen ohne Einfluss auf deren Enzymaktivität ist. Die Verwendung eines zusätzlichen „linkers“ zwischen den Proteinanteilen Ble und Cre hatte bei der Verwendung in *E. coli* keinen erkennbaren Einfluss. Die Fusionsproteine Ble-Cre, Ble-L-Cre und GFP-L-Cre waren alle funktionell.

	Rekombinationsassay		
	<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>	in <i>C. reinhardtii</i>
<b>Cre</b>	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>	<b>negativ</b>
<b>GFP-L-Cre</b>	<b>positiv</b>	<b>negativ</b>	<b>negativ</b>
<b>Ble-Cre</b>	<b>positiv</b>	<b>negativ</b>	nicht untersucht
<b>Ble-L-Cre</b>	<b>positiv</b>	<b>negativ</b>	nicht untersucht

Tab. 4.2-a Rekombinaseaktivität der in *E. coli* heterolog exprimierten Cre-Enzyme.

Im Gegensatz zur *in vivo* Rekombinaseaktivität konnte, mit Ausnahme der Cre-Rekombinase alleine, für die gereinigten Cre-Fusionsproteine keine Aktivität nachgewiesen werden. Die fehlende Rekombinaseaktivität kann verschiedene Ursachen haben. Ein Problem könnte sich durch die Lagerung der Cre-Rekombinase ergeben haben. Das Enzym weist die Eigenschaft auf, leicht zu aggregieren, was beim Pufferwechsel zur Präzipitation und somit zu einer Inaktivierung des Enzyms führte (49, 177). Infolgedessen kann die Konzentration an aktivem Protein für eine erfolgreiche Rekombination der *lox*-Sequenzen zu gering sein.

In *C. reinhardtii* konnte ebenfalls weder mit der FITC-markierten Cre-Rekombinase noch mit dem Fusionsprotein GFP-L-Cre ein erfolgreiches Rekombinationsereignis nachgewiesen werden. Hier wirkte sich möglicherweise die Elektroporation - die verwendete Methode zur Einschleusung des Proteins in die lebenden Zellen - zusätzlich negativ auf die Enzymaktivität aus. Die Elektroporation wurde weitestgehend unter den Reaktionsbedingungen (Elektroporationspuffer, Stromstärke, Dauer des Impulses, Behandlung der Zellen) durchgeführt, wie sie bereits von Hayashi et. al erfolgreich beschrieben wurden. Die Einschleusung von Kaninchen-Aktin in unbewegliche *Chlamydomonas*-Mutanten führte in

diesem Experiment bei 20% der behandelten Zellen zur Wiederherstellung der Flagellenfunktion und ihrer Beweglichkeit (63, 64). Bei der Einführung der Cre-Rekombinase (als FITC-Cre bzw. GFP-L-Cre) mittels Elektroporation in die Algenzellen konnte dagegen weder eine Fluoreszenz im Zellkern noch eine Rekombinaseaktivität nachgewiesen werden. Das Protein lag unter diesen Reaktionsbedingungen hauptsächlich aggregiert im Medium vor. Vermutlich ist auch der verwendete Stamm *cw15Arg<sup>-</sup>A* nicht robust genug für diese Methode, da der überwiegende Teil der Algenzellen nach der Elektroporation abgestorben war.

Ein Gleichgewicht zu schaffen, das Überleben der Algen und die Einführung des Proteins in den Zellkern zu gewährleisten, und gleichzeitig geeignete Rekombinationsbedingungen für eine aktive Cre-Rekombinase zu definieren, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht erreicht werden. Aufgrund der Probleme, die beim Umgang mit den gereinigten Cre-Enzymen aufgetreten sind, wurde die Elektroporation als Methode zur Bereitstellung der Cre-Rekombinase in den Algenzellen nicht weiterverfolgt.



### 4.3 Expression der Cre-Rekombinase in *C. reinhardtii*

#### Etablierung von *cre*-Expressionsvektoren

Da die direkte Einführung des aufgereinigten Cre-Proteins zur Vermittlung der ortsgerichteten Rekombination nicht zum Erfolg führte, wurden verschiedene Vektoren für eine Expression der Cre-Rekombinase im *Chlamydomonas*-Stamm *cw15Arg<sup>-</sup>A* selbst untersucht.

Unter der Kontrolle des starken konstitutiven HSP-R-In-Promotors und mit ARG7.8 als Auxotrophiemarker wurden folgende *cre*-Sequenzen verwendet;

- ✓ das *cre*-Gen mit der Originalsequenz aus dem Bakteriophagen P1,
- ✓ ein an die Codonverwendung von *C. reinhardtii* optimiertes synthetisches *ccre*-Gen und
- ✓ ein *ccreIn*-Gen mit zusätzlichen Intronsequenzen aus dem *RBCS2*-Gen (Intron2 und 3 in ihrer natürlichen Abfolge).

Die Anzahl der argininprototrophen Transformanten lag für alle drei *cre*-Expressionsvektoren in der gleichen Größenordnung. Die immunologische Untersuchung argininprototropher Transformanten mit einem anti-Cre-Antikörper ergab allerdings für keinen der Transformationsansätze eine Koexpression der Cre-Rekombinase. Trotz nachgewiesener Integration des *cre*-Gens im *C. reinhardtii*-Genom (mit Hilfe von PCR-Reaktionen) scheint keine effiziente Transkription und Translation des Transgens zu erfolgen. Dagegen konnte für das *crluc*-Gen unter Verwendung der gleichen Expressionskassette eine Koexpression von 70-80% nachgewiesen werden (persönliche Mitteilung Dr. Eichler-Stahlberg). Die zusätzliche Einführung der *RBCS2*-Introns führte sogar zu einer 4-5fachen Erhöhung der *crluc*-Expression im Vergleich zum intronfreien Gen.

#### Etablierung von *ble-cre*-Expressionsvektoren

Da die Genexpression des *cre*-Gen trotz der durchgeführten Optimierungen (Anpassung der Codonverwendung und Integration von *RBCS2*-Introns) möglicherweise zu schwach oder infolge von Genstilllegungsmechanismen unterdrückt gewesen sein könnte, wurde das *cre*-Gen mit dem Selektionsmarker *ble* fusioniert. Die Selektion auf Zeozin sollte die Expression des Fusionsproteins Ble-Cre gewährleisten und damit zur Anreicherung *cre*-exprimierender Transformanten führen. Dafür wurden wiederum verschiedene Konstrukte untersucht;

- ✓ ein *ble-cre*-Gen, u.a. mit einem zusätzlichen Intron1 aus dem *RBCS2*-Gen im *ble*-Gen und einem „linker“ zwischen beiden Genen,
- ✓ ein *ble-ccreIn*-Gen, entsprechend dem *ble-cre*-Gen, aber mit dem codonoptimierten *ccre*-Gen und zusätzlich den Introns 2 und 3 aus dem *RBCS2*-Gen.

Die Genexpression der Fusionsgene erfolgte wieder unter der Kontrolle des konstitutiven HSP-R-In-Promotors. Die Transformation der *ble-cre*-Vektoren erfolgte zuerst im Stamm *cw15Arg<sup>-</sup>A*, welcher aber wieder nur eine geringe Anzahl an Transformanten zuließ und zu keinen stabilen zeozinresistenten Phänotypen führte. Mit dem Stamm *cw15<sup>+</sup>* konnten dagegen sowohl für die *ble-cre*-Vektoren, als auch für die *ble-ccreIn*-Vektoren zeozinresistente Klone generiert werden. Wiederum wurde ein Konstrukt, welches die Expression eines Ble-rLuc-Fusionsproteins erlaubte, als Kontrolle für die Transformationseffizienz und die Expression von Ble-Fusionsproteinen mituntersucht. Die Transformationsrate ergab für den *ble-crluc*-Vektor bis zu 10-mal höhere Transformationsraten im Vergleich zu den *ble-ccreIn*-Vektoren und bis zu 15-mal so viele Transformanten im Vergleich zu den *ble-cre*-Vektoren. Des Weiteren konnte für keinen der Ble-Cre bzw. Ble-cCre-Transformanten im Immunoblot mit dem anti-Ble-Antikörper ein Klon identifiziert werden, der das Fusionsprotein in seiner korrekten Größe von 53kDa exprimierte. Die detektierten Ble-Artefakte resultieren wahrscheinlich aus der Integration des *ble*-Gens „downstream“ eines *Chlamydomonas*-Promotors („promotor trapping“) oder aus der Fusion mit anderen Genen aus *C. reinhardtii*. Dagegen konnte für die Ble-crLuc-Transformanten das Fusionsprotein in allen untersuchten Kulturen im erwarteten Molekulargewichtsbereich von 52kDa nachgewiesen werden. Die niedrige Transformationseffizienz im Vergleich zur Kontrolle und die unvollständige Expression der Ble-Cre-Fusionsproteine sind eindeutige Hinweise auf einen toxischen Effekt der Cre-Rekombinase in *C. reinhardtii*. Sowohl die Generierung zeozinresistenter Transformanten, die das *ble-cre*-Gen nur unvollständig exprimierten als auch die fehlende Koexpression des *cre*-Gens unter Selektion auf Arginin deuten auf eine Selektion von „falschpositiven“-Transformanten hin, die keine Expression einer aktiven Cre-Rekombinase ermöglichen.

### **Expression einer inaktiven Cre-Rekombinase**

Silver und Livingston et al. konnten für verschiedene Säugerzelllinien zeigen, dass die dauerhafte Expression der Cre-Rekombinase zu einer reduzierten Zellzahl, veränderter Proliferation der Zellen sowie zu Umstrukturierungen des Genoms und Chromosomenaberrationen führen kann (152). Eine mögliche Ursache für die unspezifische Rekombinaseaktivität in Abwesenheit spezifischer Erkennungssequenzen können endogene Zielsequenzen, so genannte kryptische *lox*-Sequenzen sein, wie sie außer in Säugerzellen (146, 168), im Mausgenom, im Chloroplastengenom von Pflanzen und in Hefe identifiziert wurden (21, 139, 142). Die Existenz der Wildtypsequenz *loxP* konnte mittels „blast“-Analyse

im *Chlamydomonas*-Genom ausgeschlossen werden, aber kryptische *lox*-Sequenzen mit bisher unbekannter Basenzusammensetzung sind auch in *C. reinhardtii* möglich. Durch den Austausch des aktiven Tyrosin-Rests Tyr<sub>324</sub> in der Cre-Rekombinase gegen ein Phenylalanin wurde die genotoxische Wirkung des Enzyms weitgehend eliminiert, die Säugerzellen zeigten wieder eine normale Entwicklung (152).

In *C. reinhardtii* konnte dagegen durch den Austausch des Tyrosin-Rests gegen Phenylalanin keine Expression des inaktiven Enzyms erreicht werden. Weder die Koexpression der inaktiven Cre-Rekombinase (Cre\*) mit ARG7.8 als Auxotrophiemarker noch die korrekte Expression eines Ble-Cre\*-Fusionsproteins unter Kontrolle des HSP-R-In-Promotors waren erfolgreich. Möglicherweise spielen in *C. reinhardtii*, ähnlich wie im Kerngenom der Pflanzen, vielmehr zytotoxische Effekte eine Rolle (20). Da es sich bei der Cre-Rekombinase um ein DNA-bindendes Protein handelt (1), können trotz der Eliminierung des aktiven Tyrosin-Rests Prozesse wie DNA-Replikation oder Transkription gestört und somit die normale Entwicklung der Zellen unterbunden sein.

Da die konstitutive Expression unter dem starken HSP-R-In-Promotor weder für die aktive Cre-Rekombinase noch für das inaktive Enzym in *C. reinhardtii* zum Erfolg führten, wurde für die Lokalisierung des Enzyms im Kern die „Cre-Selbsteliminierungs“-Strategie gewählt.

### „Cre-Selbsteliminierungs“-Strategie

Die Verwendung eines „Cre-Selbsteliminierungs“-Vektors („CSE“-Vektor) wurde bereits in Säugerzellen und Pflanzen praktiziert und erlaubt eine kurzzeitige Cre-Expression ohne spätere unspezifische Nebenreaktionen im Genom (67, 98, 152). In dieser Arbeit konnte für jeden der untersuchten „CSE“-Vektoren (mit der *loxP*-, *loxAC*- bzw. *loxGA*-Sequenz, siehe Abb. 3.8-c) eine transiente Expression einer funktionellen Cre-Rekombinase in *C. reinhardtii* über ihre Rekombinaseaktivität nachgewiesen werden. Das Cre-Enzym erkennt ihre *lox*-Erkennungssequenzen, rekombiniert sie und eliminiert infolgedessen ihre eigene kodierende Sequenz. Die erwartete Expressionskassette konnte für alle drei „CSE“-Vektoren sowohl durch PCR-Reaktion, Sequenzierung und Southern Blot-Analyse bestätigt werden.

Da mit dem „CSE“-Vektor nur das Endergebnis der ortsgerichteten Rekombination, also die Aktivierung des *aphVIII*-Gens untersucht werden konnte, war eine Aussage, zu welchem Zeitpunkt die Rekombination erfolgt, nicht möglich. Die Rekombination könnte sowohl extrachromosomal, d.h. im „CSE“-Vektor selbst oder nach dessen Integration in das *C. reinhardtii*-Genom stattgefunden haben. Bis zum jetzigen Zeitpunkt gibt es aber keinen Beweis für die Expression rekombinanter extrachromosomaler DNA in *C. reinhardtii*.

Mit Hilfe eines stringent induzierbaren Promotors könnte die Cre-vermittelte Rekombination chromosomaler *lox*-Sequenzen nach erfolgter Integration des „CSE“-Vektors in das Genom und nachfolgender Induktion der Cre-Expression überprüft werden. Der *CYC6*-Promotor, welcher eine Möglichkeit zur regulierbaren Expression unter Induktion mit Nickelionen in *C. reinhardtii* bietet (127), führt aber bereits in Abwesenheit des  $\text{Ni}^{2+}$  zu einer schwachen Basalexpression (persönliche Mitteilung Dr. Markus Heitzer). Um aber die vollständige Integration des nichtrekombinierten „CSE“-Vektors in das *Chlamydomonas*-Genom zu gewährleisten, ist die stringente Regulierung der *ccreIn*-Genexpression zwingend erforderlich. Auch in Pflanzen konnte bei der Verwendung induzierbarer Promotoren eine niedrige Basalexpression, die zur unkontrollierten Expression und der daraus resultierenden Eliminierung des *cre*-Gens führt, nicht verhindert werden (67). Daher wurde die Cre-Rekombinaseaktivität im Kerngenom von *C. reinhardtii* mit Hilfe eines Rekombinationsassays überprüft.

In Abb. 4.3-a sind noch einmal die verschiedenen Strategien für die *cre*-Expression in *C. reinhardtii* zusammengefasst.

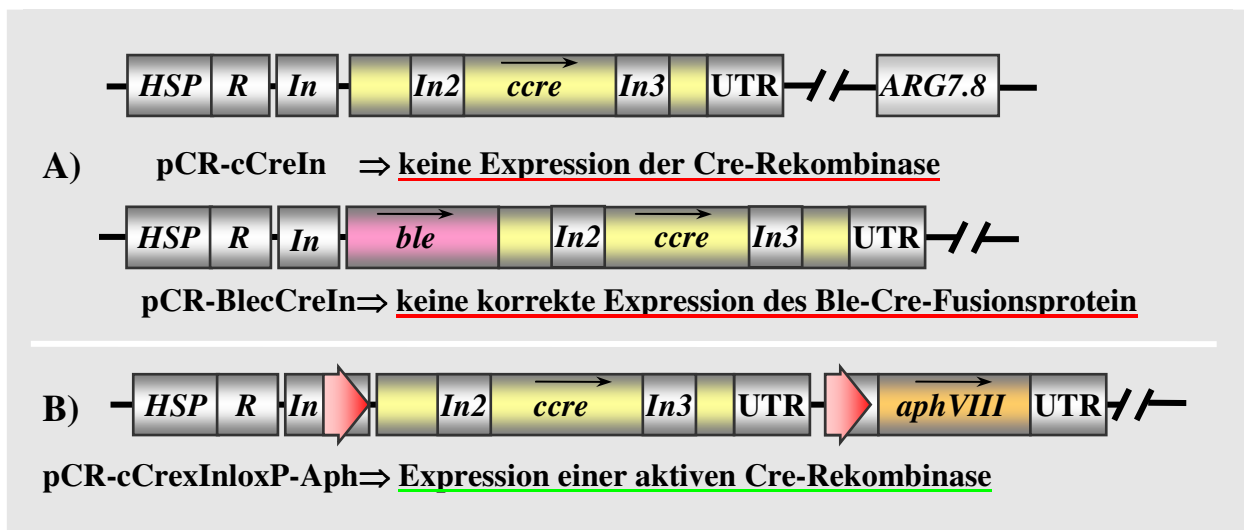
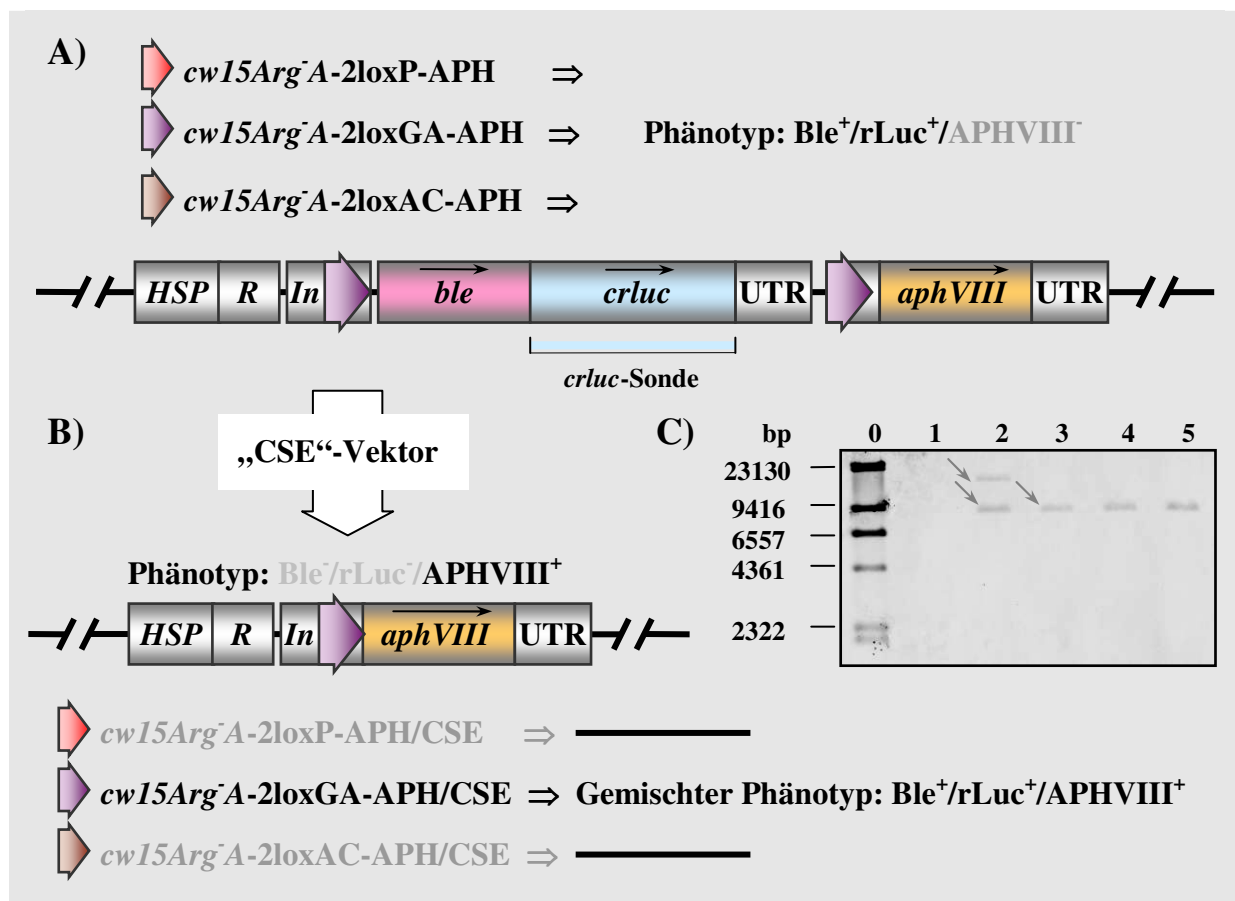


Abb. 4.3-a Verschiedene Strategien für die Expression der Cre-Rekombinase in *C. reinhardtii*. A) Konstitutive Expression des *ccreIn*- bzw. des *ble-ccreIn*-Gens. B) „Cre-Selbsteliminierungs“-Strategie.

#### 4.4 Cre-vermittelte Rekombination in *C. reinhardtii*-lox-Rezipienten

Die ortsgerichtete Rekombination chromosomaler *lox*-Sequenzen durch die Cre-Rekombinase wurde mit Hilfe der *lox*-Rezipienten *cw15Arg<sup>-</sup>A*-2loxP-APH, -2loxGA-APH und -2loxAC-APH (Phänotyp: zeozinresistent, luciferaseaktiv, paromomyzinsensitiv) untersucht. Nur für die *cw15Arg<sup>-</sup>A*-2loxGA-APH-Kultur konnten nach der Transformation mit dem „CSE“-Vektor paromomyzinresistente Klone selektiert werden, siehe Abb. 4.4-a. Teil A und B. Möglicherweise lagen bei den beiden anderen Transformanten *cw15Arg<sup>-</sup>A*-2loxP-APH und -2loxAC-APH unvollständige *lox*-Expressionskassetten vor. Ebenso könnten die *lox*-Sequenzen beschädigt gewesen sein oder der Zugang durch die Cre-Rekombinase ist aufgrund der chromosomalen Struktur gehindert. Alle drei Möglichkeiten waren durch die Überprüfung mit der überlappenden PCR nicht zu erkennen.



**Abb. 4.4-a Cre-vermittelte Rekombination in *C. reinhardtii*-lox-Rezipienten.** A) *cw15Arg<sup>-</sup>A*-2loxGA-APH-Rezipienten mit funktioneller *loxGA*-Expressionskassette vor der Rekombination. B) Transformation mit „CSE“-Vektor und transiente Cre-Expression führen nur für die funktionelle *loxGA*-Expressionskassette zur Eliminierung des *ble-crluc*-Fusionsgens (nicht abgebildet) und zur Aktivierung des *aphVIII*-Gens. C) Detektion des *Hind*III-Restriktionsverdaus genomischer DNA mit der *crluc*-Sonde im Southern Blot: Spur 0) DIG-gelabelter DNA-Molekulargewichtsstandard, 1) *cw15Arg<sup>-</sup>A*, 2) untransformierter *cw15Arg<sup>-</sup>A*-2loxGA-APH, 3-5) *cw15Arg<sup>-</sup>A*-2loxGA-APH/CSE-Transformanten Nr. 2, 10 und 12.

Die *cw15Arg<sup>-</sup>A-2loxGA-APH/CSE*-Transformanten zeigten dagegen aufgrund der Doppelinsertion den gemischten Phänotyp - zeozinresistent, luciferaseaktiv (entspricht dem vor der Rekombination) und paromomycinresistent (nach erfolgter Rekombination). Die Untersuchung der *cw15Arg<sup>-</sup>A-2loxGA-APH/CSE*-Transformanten (Nr. 2, 10 und 12) durch Southern Blot-Analyse bestätigte die erfolgreiche Rekombination einer funktionellen *loxGA*-Expressionskassette und das Vorhandensein einer weiteren nichtfunktionellen Kassette (siehe Abb. 4.4-a Teil C). Die Doppelinsertion der *lox*-Expressionskassette wirkte sich bei dem Assay zum einen negativ auf die Untersuchung möglicher rekombinierter Transformanten aus (kein eindeutig selektierbarer Phänotyp, d.h. sowohl zeozinresistent als auch paromomycinresistent) und zum anderen wurde die Expression des Reportergens *ble-crluc* nach kurzer Kultivierungszeit vermutlich infolge von Silencingmechanismen stillgelegt. Durch die Cre-vermittelte Eliminierung der funktionellen *ble-crluc*-Kassette des *cw15Arg<sup>-</sup>A-2loxP-APH*-Rezipienten konnte aber eine Reaktivierung des Phänotypen – zeozinresistent und luciferaseaktiv - für die *cw15Arg<sup>-</sup>A-2loxGA-APH/CSE*-Transformanten beobachtet werden. In *Arabidopsis* wurde bereits gezeigt, dass die Auflösung von Mehrfachinsertionen zur Aufhebung der Genstilllegung führen kann (27). Um für *Chlamydomonas* dies bezüglich Rückschlüsse ziehen zu können, müssten noch weitere *lox*-Transformanten mit Mehrfachinsertionen auf die Veränderung der Expression untersucht werden. Da aber im Rahmen dieser Arbeit die prinzipielle Realisierung der ortsgerichteten Rekombination im Vordergrund stand, wurde dieser Ansatz vorerst nicht weiterverfolgt. Neben der *cw15Arg<sup>-</sup>A-2loxGA-APH*-Transformante stehen mittlerweile noch zwei weitere *cw15<sup>+</sup>-2loxP-APH*-Transformanten mit jeweils einer vollständig integrierten *loxP*-Expressionskassette für den Rekombinationsassay zu Verfügung. Die Untersuchung dieser *lox*-Rezipienten konnte aber bis zum Ende dieser Arbeit noch nicht abgeschlossen werden.

Trotzdem konnte eindeutig gezeigt werden, dass das *Cre/lox*-System eine viel versprechende Methode zur Eliminierung oder zur reversiblen Integration von DNA-Sequenzen (z.B. Selektionsmarker) darstellt. Des Weiteren wurde durch die Verwendung des „Cre-Selbsteliminierungs“-Vektors eine Möglichkeit geschaffen, die aktive Cre-Rekombinase im Zellkern der Algen bereitzustellen und das Zeitfenster der Expression so zu minimieren, dass sowohl die Selbsteliminierung der *cre*-Sequenz als auch die davon unabhängige Rekombination *lox*-flankierter chromosomaler DNA an einem anderen Genort erfolgt, ungewollte Nebenreaktionen durch die Cre-Rekombinase auf das Genom aber vermieden werden.

## 4.5 Ausblick

### Charakterisierung des Rekombinationsereignisses im *C. reinhardtii*-Genom

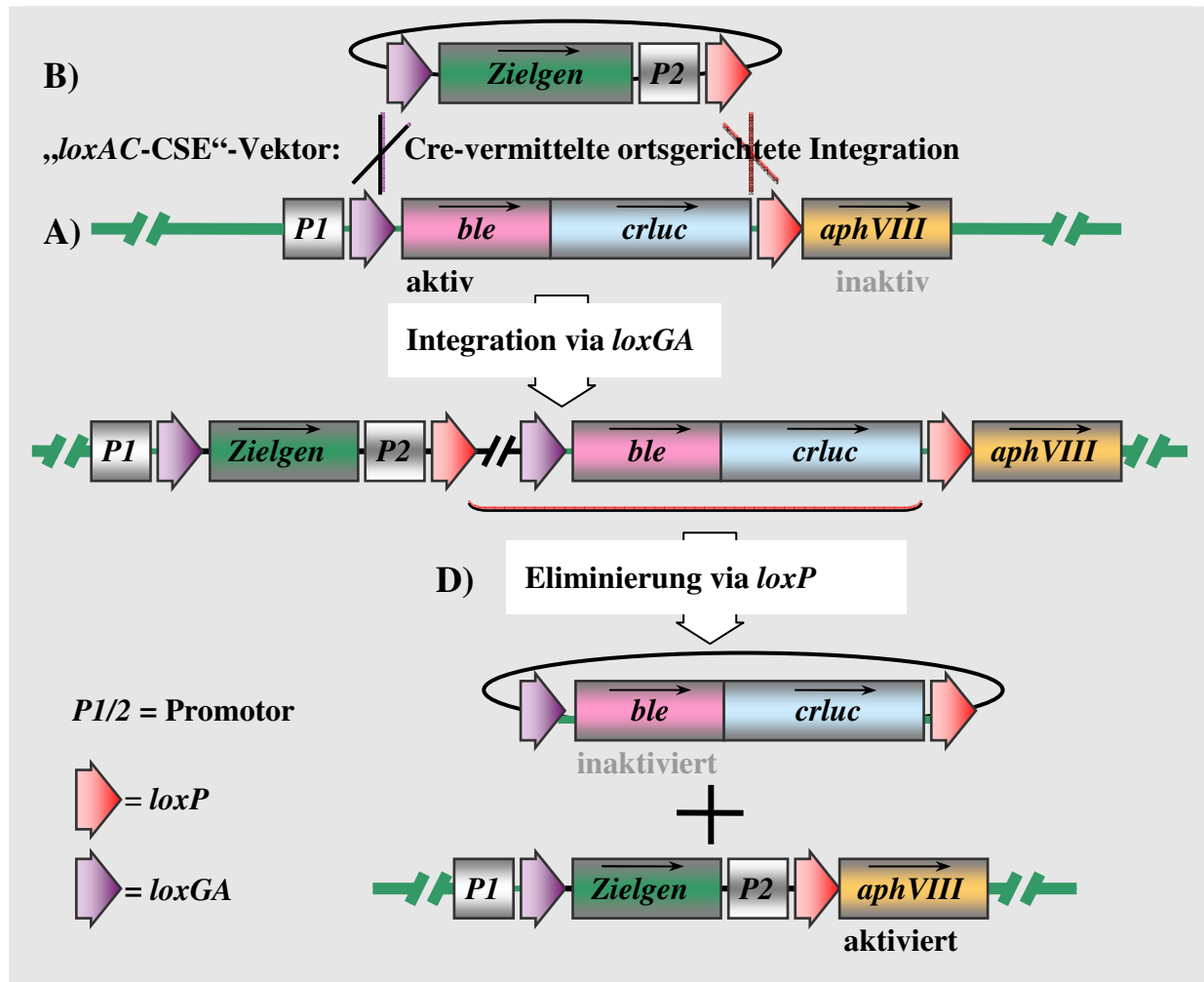
Trotz des erfolgreichen Nachweises der Funktionalität des Cre/*lox*-Systems im Kerngenom von *C. reinhardtii* sind weitere Fragen ungeklärt, z.B. ob es zu Umstrukturierungen oder Deletionen in der benachbarten Chromatinstruktur kommen kann. Ebenfalls von Interesse ist der Verbleib der bei der Rekombination entstandenen zirkulären DNA, wenngleich für keine der bisher analysierten *cw15Arg<sup>+</sup>A-2loxGA-APH/CSE*-Transformanten die *ble-crluc*-Expressionskassette nach erfolgreicher Rekombination im Genom mittels Southern Blot-Analyse nachgewiesen werden konnte. Ob die limitierte Expression der Cre-Rekombinase im Zellkern genügt, um eine mögliche wenn auch kinetisch ungünstige Reintegration der zuvor eliminierten DNA in die verbleibende chromosomale *lox*-Sequenz im *C. reinhardtii*-Genom zu verhindern, wird erst die Untersuchung weiterer *lox*-Rezipienten zeigen. Auch kann eine mögliche ungerichtete Integration des DNA-Fragments mittels nichthomologer Rekombination an eine andere Stelle im Genom zum jetzigen Kenntnisstand nicht völlig ausgeschlossen werden.

### Reversible Integration von DNA-Sequenzen mittels Kassettenaustausch

Neben der Untersuchung des Rekombinationsereignisses für die Cre-vermittelte Eliminierung *lox*-flankierter chromosomaler DNA aus dem Genom (wie z.B. von Selektionsmarkern) steht aber die gezielte Integration von DNA an einen definierten Genlocus mit *lox*-Sequenz im Vordergrund. Auf diese Weise könnten Positionseffekte oder Mehrfachinsertionen, die oftmals mit der ungerichteten Transformation einhergehen, ausgeschlossen werden.

Der gezielte Austausch von regulatorischen Sequenzen (Promotoren, Introns, 3'-UTRs) und von kodierenden Sequenzen (Reportergene, Gene ohne selektierbaren Phänotyp) könnte mit dem Cre-vermittelten Kassettenaustausch realisiert werden. Für diese Anwendung müsste ein zusätzlicher *lox*-Rezipientenstamm generiert werden. Der Unterschied zum bisherigen *lox*-Stamm (zwei identischen *lox*-Sequenzen gleicher Orientierung), liegt in der gleichzeitigen Verwendung der Wildtypsequenz *loxP* und einer heterospezifischen *lox*-Sequenz (*loxGA* oder *loxAC*) im gleichen Konstrukt, dies soll die Eliminierung der DNA zwischen den *lox*-Sequenzen verhindern. Die Rekombination zweier identischer *lox*-Sequenzen (*loxP*, *loxGA* und *loxAC*) in *C. reinhardtii* wurde bei der „Cre-Selbsteliminierungs“-Strategie im *cw15<sup>+</sup>*-Stamm bereits nachgewiesen. Lee und Saito haben gezeigt, dass diese heterospezifischen *lox*-Sequenzen *loxAC* und *loxGA* *in vitro* weder miteinander noch mit der Wildtypsequenz *loxP* rekombinieren und somit für den Kassettenaustausch geeignet sind (89).

Das Prinzip des Kassettenaustausches ist als Zweistufenprozess in Abb. 4.5-a dargestellt und sollte nach dem folgenden Schema erfolgen:



**Abb. 4.5-a** Cre-vermittelter Kassettenaustausch in *C. reinhardtii* dargestellt als Zweistufenprozess.

- Einführung einer *loxGA/loxP*-Expressionskassette mit *ble-crluc* als Reportergen und einem promotorlosen inaktiven *aphVIII*-Gen durch ungerichtete Transformation (Selektion für Phänotyp: zeozinresistent, luciferaseaktiv, paromomyzinsensitiv)
- Austauschkassette mit dem entsprechenden promotorlosen Zielgen und einem separaten Promotor („downstream“) zwischen der zweiten *loxGA*- und *loxP*-Sequenz
- Rekombination vermittelt durch die Cre-Rekombinase (Kotransformation mit „*loxAC*-CSE“-Vektor) führt zur Integration der Austauschkassette, dargestellt für *loxGA* (*loxP* ist ebenfalls möglich)
- Eliminierung der *loxP*-Kassette führt zur Aktivierung des *aphVIII*-Gens unter Kontrolle des *P2*-Promotors (Selektion für Phänotypen: zeozinsensitiv, luciferasenegativ, paromomyzinresistent), Eliminierung der *loxGA*-Kassette resultiert in paromomyzinsensitivem Ausgangskonstrukt.

Auf diese Weise sollte die Expression des gewünschten Gens unter reproduzierbaren Bedingungen am gleichen Genlocus und die Analyse diverser Problemstellungen unabhängig von Positionseffekten gewährleistet sein.



## **5 MATERIAL**

### **5.1 Laborutensilien**

<b>Laborutensilien</b>	<b>Hersteller</b>
3MM-Chromatographiepapier	Whatman
Autoklavierband	Roth
Centricon D10	Amicon (Millipore)
Chromatographiesäulchen	Sigma-Aldrich
Dialyseklammern, -schläuche	Roth
Eppendorfreaktionsgefäße	Eppendorf
Falcon Tubes	Roth
Glasgeräte	Schott, Brand
Glassperlen 0,45mm	Braun
Hybond-N <sup>+</sup> Nylonmembran	Amersham Biosciences
Kulturplatten 24-Well	Nunc
Mikrotiterplatten 96-Well	VWR International
Nitrocellulosemembran	Amersham Biosciences
PCR-Platten	Abgene
PCR-Reaktionsgefäße	Biozym
Pipetten, Serologische Pipetten	Gilson, Eppendorf, Roth
Pipettenspitzen	Gilson, Sarstedt, Biozym
Rührfische	Roth

### **5.2 Geräte**

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller</b>
Analysenwaagen, Feinwaagen	Sartorius
Autoklav	H+P Labortechnik
Blotapparatur	PeqLab
Brutschränke	Heraeus, Binder
Eismaschine	Scotsman
Elektroporationsapparatur	Biorad
Folienschweißgerät	Krups
Gelapparaturen für Agarose- und SDS-Gele	Eigenbau, Universität Regensburg
Gelfotodokumentation	Vilber Lourmat, PeqLab
Gelschüttler	Heidolph
Geltrockner	Biorad
Heizblock	Eppendorf, BIOBLOCK SCIENTIFIC

## MATERIAL

Geräte	Hersteller
Hybridisierungssofen	Affimetrix
Kryokontainer	Nunc
Kühlschränke	Privileg, Liebherr
Kulturenschüttler	New Brunswick Scientific; Binder
Luminometer Polarstar optima	BMG
Lyophylle	Steris
Magnetrührer	Heidolph
Mikroskop, Fluoreszenzmikroskop	Leica
Mikrowelle	Privileg
PCR-Thermocycler	Thermo Hybaid, Applied Biosystems
pH-Meter	Mettler Toledo
Pumpe	Amersham Bioscience
Reinstwassersystem	Millipore, Vivendy Water Systems
Spannungsquellen	LKB Bromma, Consort
Spektralphotometer	Amersham Bioscience
Sterilbank	Heraeus
Trockenschrank	Heraeus
Ultraschallgerät	Branson
UV-Crosslinker	Stratagene
UV-Schirm	Vilber Luormat
Videoprinter	Mitsubishi
Vortex Schüttler	VWR International
Wasserbad	Lauda, Haake, GFL THERMOLAB
Zentrifugen	Heraus, Beckman, DuPont Sorvall, Eppendorf

### 5.3 Software

Software	Hersteller
Chromas	Technelysium
DNAMAN	Lynnon Biosoft
FluoStar* Optima	BMG
Graphical codon usage analyzer (gcua 2.0)	GENEART
Oligocreater	KFB Regensburg
pDraw32	Acacloone

## 5.4 Biochemikalien

Biochemikalien	Hersteller
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP)	Sigma
5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktosid (X-Gal)	Sigma
Agar	Difco
Agarose	PeqLab
Ammoniumperoxodisulfat	Roth
Ampicillin	Sigma
Bacto Yeast Extract	Difco
Chloramphenicol	Sigma
Coelenterazin	PJK GmbH
Coomassie Brilliant Blue G-250, R-250	Serva
D-Glucose, Monohydrat	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
DNA MW Marker	Fermentas
DNA MW Marker II, DIG-labeled	Roche
dNTPs	Fermentas
Ethanol	J.T. Baker
Ethidiumbromid	Sigma
Ethylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz (EDTA)	Sigma
Guanidiniumthiocyanat	Sigma
Imidazol	Roth
Isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galaktosid (IPTG)	Applichem
Kanamycin	Applichem
Magermilchpulver	Frema
Magnesiumsulfat	Sigma
N,N,N-Trimethylglycin-Monohydrat (Betain)	Sigma
N,N-Dimethylformamid	Acros
Natriumcarbonat	Riedel
Nickel(II)-Sulfat, Hexahydrat	Fluka
Ni-NTA-Säulenmaterial	Qiagen
Nitroblautetrazolium (NBT)	Sigma
Oligonukleotide	Metabion
Paromomycin	Sigma
Ponceau S	Applichem
Prestained protein MW Standard	Fermentas
Protein MW Standard	Fermentas, Sigma
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, PIERCE
Rotiphorese Gel 30	Roth

## MATERIAL

Biochemikalien	Hersteller
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	USB
TritonX-100	Fluka
Zeozin	InvivoGen

Alle weiteren Biochemikalien wurden von der Firma Merck bezogen.

### 5.5 Enzyme und Antikörper

Enzyme	Hersteller
Calf Intestinal Phosphatase	Roche
Cre-Rekombinase	Eigenisolat aus <i>E. coli</i> , New England Biolabs (NEB)
DIG High Prime	Roche
Expand High Fidelity PCR-System	Roche
GC-RICH PCR System	Roche
Klenow-Fragment	Fermentas
Restriktionsenzyme	Amersham Pharmacia, Fermentas, NEB
Shrimp Alkaline Phosphatase	Roche
T4-DNA-Ligase	Fermentas
T4-Polynukleotidkinase	Fermentas
Taq-DNA-Polymerase	Fermentas, Eigenisolat aus <i>E. coli</i>
Vent-Polymerase	NEB

Antikörper (eingesetzte Verdünnung)	Hersteller
Anti-Digoxigenin- Alkalische Phosphatase (AP)-Antikörper (1:5000)	Roche
anti-Kaninchen-IgG-AP-Konjugat (1:2000)	Sigma
anti-Maus-IgG-AP-Konjugat (1:2000)	Sigma
Kaninchen-anti-Ble-Antikörper (polyklonal) (1:1000)	InvivoGen, Cayla
Kaninchen-anti-Cre-Antikörper (polyklonal) (1:1000)	Novagen, Antigen Cre in <i>E. coli</i> exprimiert, Produktion des Antikörpers durch Pineda Antikörper-Service, persönl. Aufreinigung
Maus-anti- <i>Renilla</i> -Luc-Antikörper (monoklonal) (1:2000)	Chemicon International

## 5.6 Kits

Kits	Hersteller
DIG Easy Hyb Kit, Wash and Blocking Set	Roche
DNeasy® Plant Mini Kit	Qiagen
FluoReporter® FITC Protein Labeling Kit	Molecular Probes
Gene builder™ Gene synthesis Kit	KFB Regensburg
NucleoSpin® Plasmid, -Extract II	MACHERY-NAGEL
Wizard® Genomic DNA Purification Kit, pGEM-T®-Vector System	Promega

## 5.7 Puffer, Lösungen und Nährmedien

Puffer	Zusammensetzung
20xSSC	3M NaCl; 300mM Na-Citrat; pH= 7,0
Bindepuffer mod. (125)	10mM Imidazol; 700mM NaCl; 50mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH= 8,0
Blotpuffer	48mM Tris/HCl; 39mM Glycin; 0,1% SDS; pH= 9,2
Denaturierungspuffer	0,5M NaOH; 1,5M NaCl
Detektionspuffer	100mM Tris/HCl; 100mM NaCl; pH= 9,5
Dialysepuffer	200mM NaCl; 50mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH= 8,0
Elektroporationspuffer nach (63)	200mM ATP; 0,8mM Imidazol; 0,1mM CaCl <sub>2</sub> ; 60mM Saccharose; 0,5mM β-Mercaptoethanol; pH= 7,5
Elutionspuffer mod. (125)	250mM Imidazol; 700mM NaCl; 50mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH= 8,0
Ladepuffer für Ni-NTA	100mM NiSO <sub>4</sub>
Laufpuffer (87)	25mM Tris; 200mM Glyzin; 0,1% SDS
Lysepuffer	100mM NaOH; 2M NaCl; 0,5% SDS
Neutralisationspuffer	0,5M Tris/HCl; 1,5M NaCl; pH= 7,5
PBS	150mM NaCl; 16mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 1,8mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
PBS/Tween	150mM NaCl; 16mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 1,8mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 0,05% Tween20
PCR-Reaktionspuffer	10mM Tris/HCl; 10mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; 1,5mM MgCl <sub>2</sub> ; 20mM KCl; 3% Saccharose; Bromphenolblau; pH= 8,8
Rekombinationspuffer	50mM Tris/HCl; 10mM MgCl <sub>2</sub> ; 30mM NaCl; 0,1mg/ml BSA; pH= 7,5
SDS-Probenpuffer (87)	50mM Tris/HCl; 2% SDS; 10% Glycerin; 1,5% DTT, Bromphenolblau; pH= 6,8
Strippuffer mod. (125)	100mM EDTA; 700mM NaCl; 50mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH= 8,0
TAE	40mM Tris/Acetat; 1mM EDTA; pH= 8,2
TFBI	30mM KAc; 50mM MnCl <sub>2</sub> ; 100mM KCl; 15% Glycerin; pH= 8,5
TFBII	10mM MOPS; 75mM CaCl <sub>2</sub> ; 10mM KCl; 15% Glycerin; pH= 7,0
Waschpuffer mod. (125)	20mM Imidazol; 700mM NaCl; 50mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH= 8,0

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Puffer in ihrer eingesetzten Endkonzentration angegeben.

## MATERIAL

Lösungen	Zusammensetzung
<b>BCIP-Lösung</b>	10mg/ml in 100% N,N'-dimethylformamid
<b>Bradford-Reagenz</b>	100mg Coomassie Brilliant Blue G-250; 50ml 95% Ethanol; 100 ml 85%ige H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ; ad 1l; filtriert
<b>Coomassie-Färbelösung</b>	400ml MeOH; 300ml H <sub>2</sub> O; 80ml HOAc; 2,2g Brilliant Blue Coomassie R-250
<b>NBT-Lösung</b>	62,5mg/ml in 70%igem N,N'-dimethylformamid
<b>Ponceau S-Färbelösung</b>	0,2% Ponceau S; 3% Trichloressigsäure; 3%ige Sulfosalicylsäure
<b>Spurenelemente-Mischung mod. (68)</b>	22g ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O; 11,4g H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ; 5,06g MgCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O; 4,99g FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O; 1,61g CoCl <sub>2</sub> ; 1,57g CuSO <sub>4</sub> ; 1,1g (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·2H <sub>2</sub> O; 50g EDTA; ad 1l
<b>X-Gal-Lösung</b>	20mg/ml in 100%igem N,N'-dimethylformamid

Nährmedien	Zusammensetzung
<b>2xYT</b>	1,6% Bacto Trypton; 1% Bacto Yeast Extract; 1% NaCl; pH= 7,0
<b>LB</b>	0,1% Bacto Trypton; 0,5% Bacto Yeast Extract; 1% NaCl; pH= 7,0
<b>SOB</b>	2% Bacto Trypton; 0,5% Bacto Yeast Extract; 2,5mM KCl; 10mM MgCl <sub>2</sub> ; pH= 7,0
<b>SOC</b>	SOB + 20mM Glucose
<b>TAP</b>	0,6mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 0,4mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 0,4mM MgSO <sub>4</sub> ; 0,34mM CaCl <sub>2</sub> ; 7,5mM NH <sub>4</sub> Cl; 0,1% Spurenelemente-Mischung; 20mM Tris/HCl; pH= 7,0 (mit HOAc)

Wenn nicht anders beschrieben, wurden alle Lösungen, Puffer und Nährmedien mit ddH<sub>2</sub>O hergestellt und wenn erforderlich, autoklaviert. Die Zugabe hitzelabiler Substanzen (Antibiotika, Arginin oder Glucose) zum Nährmedium erfolgte nach dem Autoklavieren. Nährmedien für Platten wurden zusätzlich mit 1,6% Agar für *E. coli*-Kulturen bzw. 1,3% Agar für *C. reinhardtii*-Kulturen versetzt.

### 5.8 Verwendete Stämme

<i>E. coli</i>	Genotyp
<b>DH5α</b>	F <sup>-</sup> endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ( <i>lacZYA-argF</i> )U169, hsdR17(r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ), λ <sup>-</sup>
<b>DH10B</b>	F <sup>-</sup> endA1 recA1 galU galK deoR nupG rpsL Δ <i>lacX</i> 74 Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 araD139 Δ( <i>ara,leu</i> )7697 mcrA Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) λ <sup>-</sup>
<b>ER2566</b>	F- λ <sup>-</sup> fhuA2 [lon] ompT <i>lacZ</i> ::T7 gene 1 gal sulA11 Δ( <i>mcrC-mrr</i> )114::IS10 R( <i>mcr-73::miniTn10-TetS</i> )2 R( <i>zgb-210::Tn10</i> )(TetS) endA1 [dcm]
<b>PIR1</b>	F- Δ <i>lac</i> 196 rpoS (Am) robAi creCS10 hsdR514 endA recA1 uidA(Δ <i>MluI</i> )::pir-116
<i>C. reinhardtii</i>	
<b><i>cw15Arg<sup>-</sup>A</i></b>	
<b><i>cw15<sup>+</sup></i></b>	

## 5.9 Fremde Plasmide

Vektorname	Herkunft	Charakteristische Merkmale
pARG7.8	R. Debuchy (28)	genomische ARG7.8-Sequenz inklusive 5' und 3'-UTR
pET16b	Novagen	Expressionsvektor
pGEM-T	Promega	Klonierungsvektor mit 3'-T-Überhang
pKS-	Fermentas	Klonierungsvektor
pKS-cGFP	Dr. M. Fuhrmann (42)	an <i>C. reinhardtii</i> cdn. optimiertes <i>gfp</i> -Gen ( <i>cgfp</i> )
pPICZ-E	Invitrogen	Rezipientenvektor mit <i>ble</i> -Gen und <i>oriColE1</i>
pSI105	I. Sizowa (153)	<i>aphVIII</i> -Marker hinter HSP-R-In-Promotor, genomische ARG7.8-Sequenz
pSP109	Dr. S. Purton (160)	<i>ble</i> -Gen zwischen <i>RBCS2</i> -Promotor und 3'-UTR
pSP124S	Dr. S. Purton (160)	<i>bleIn</i> -Gen (mit <i>RBCS2</i> -Intron1) zwischen <i>RBCS2</i> -Promotor und 3'-UTR
pUC18	Fermentas	Klonierungsvektor
pUNI-Solo	Invitrogen	pPICZ-E/Uni-LacZ/ <i>Bam</i> HI/religiert
pXX105	Dr. M. Heitzer	<i>bleIn-crluc</i> hinter HSP-R-In-Promotor mit <i>Eco</i> RI im <i>RBCS2</i> -Intron1
pXX106	Dr. M. Heitzer	<i>bleIn-crluc</i> hinter HSP-R-In-Promotor mit <i>loxGA</i> im <i>RBCS2</i> -Intron1
pXX107	Dr. M. Heitzer	<i>bleIn-crluc</i> hinter HSP-R-In-Promotor mit <i>loxP</i> im <i>RBCS2</i> -Intron1
pXX110	Dr. M. Heitzer	<i>bleIn-crluc</i> hinter HSP-R-In-Promotor mit <i>loxAC</i> im <i>RBCS2</i> -Intron1
pXX137	Dr. M. Fuhrmann	abgewandelter Expressionsvektor pMAL-p2X, Austausch von <i>malE</i> gegen His <sub>12</sub> -Tag ( <i>Eco</i> RI/ <i>Nde</i> I), Kan <sup>r</sup>
pXX237	Dr. A. Eichler-Stahlberg	<i>crluc</i> mit <i>RBCS2</i> -Intron2 und Intron3 hinter HSP-R-In-Promotor
pXX359	Dr. M. Heitzer	an <i>C. reinhardtii</i> cdn. opt. <i>cgluc</i> -Gen hinter HSP-R-In-Promotor
pXX37	Dr. A. Eichler-Stahlberg (41)	pRbcBRL(HSP196) mit <i>bleIn-crluc</i> hinter HSP-R-In-Promotor
pXX81	Dr. M. Heitzer	pUC18 mit nls (SV40 T-Antigen), <i>cre</i> -Gen (P1), His <sub>6</sub> -Tag
pXX95	Dr. M. Heitzer	<i>bleIn-crluc</i> hinter HSP-R-In-Promotor mit <i>loxP</i> im <i>RBCS2</i> -Promotor
pXX96	Dr. M. Heitzer	<i>bleIn-crluc</i> hinter HSP-R-In-Promotor mit <i>loxGA</i> im <i>RBCS2</i> -Promotor
pXX97	Dr. M. Heitzer	<i>bleIn-crluc</i> hinter HSP-R-In-Promotor mit <i>loxAC</i> im <i>RBCS2</i> -Promotor

## 5.10 Eigene Plasmide

Vektor	Aliasname	Charakteristische Merkmale	<i>E. coli</i> Marker	<i>C. reinhardtii</i> Marker
pMM83	<b>pET-Cre</b>	pET16b:nls-cre	<i>bla</i>	
pMM120		pUC18:ble-cre	<i>bla</i>	
pMM121		pET16b:ble-cre	<i>bla</i>	
pMM136	<b>pET-BleCre</b>	pXX37:ble-cre-Teil ( <i>Sma</i> I/ <i>Bam</i> HI)		
pMM143		pKS(-):ble-Fragment aus pSP109	<i>bla</i>	
pMM146		pXX37:ble-cre	<i>bla</i>	<i>ble</i>
pMM147	<b>pCR-BleCre</b>	pKS(-):cre-Teil	<i>bla</i>	
pMM148		pET16:blel-cre (mit „linker“)	<i>bla</i>	
pMM149		pXX37:ble-cre1	<i>bla</i>	
pMM150	<b>pET-BleLCre</b>	pXX37:blel-cre	<i>bla</i>	<i>ble</i>
pMM161		pUC18:bleIn-crluc-loxP	<i>bla</i>	
pMM162		pUC18:bleIn-crluc-loxAC	<i>bla</i>	
pMM163	<b>pCR-BleLCre</b>	pUC18:bleIn-crluc-loxGA	<i>bla</i>	
pMM164		pKS(-):blel-cre	<i>bla</i>	
pMM166		pKS(-):cre	<i>bla</i>	
pMM168		pGEM-T:cgfp	<i>bla</i>	
pMM172		pKS:cgfp-cre	<i>bla</i>	
pMM180		pET16b:cgfp-cre	<i>bla</i>	
pMM191	<b>pET-cGFPLCre</b>	pKS(-):aphVIII-UTR	<i>bla</i>	
pMM198		pKS(-):loxP-aphVIII	<i>bla</i>	
pMM199		pKS(-):loxGA-aphVIII	<i>bla</i>	
pMM201		pSI105:cre/2	<i>bla</i>	
pMM202		pKS(-):loxP-bleIn-crluc-loxP-aphVIII-UTR	<i>bla</i>	<i>ble</i>
pMM203		pKS(-):loxGA-bleIn-crluc-loxGA-aphVIII-UTR	<i>bla</i>	<i>ble</i>
pMM204	<b>pCR-2loxGA-Aph</b>	pKS(-):loxAC-aphVIII	<i>bla</i>	
pMM206		pKS(-):loxAC-bleIn-crluc-loxAC-aphVIII-UTR	<i>bla</i>	<i>ble</i>
pMM207		pSI:cre	<i>bla</i>	ARG7.8
pMM256	<b>pcGFPLCre</b>	pHIS-p2X:cgfp-cre	<i>neo</i>	
pMM286		pKS(-):ccre1 ( <i>Xho</i> I-nls-ccre1-In2-Anfang)	<i>bla</i>	
pMM299		pKS(-):ccre2 (In2-Ende-ccre2 <i>Bam</i> HI)	<i>bla</i>	
pMM304		pKS(-):ccre1-In2	<i>bla</i>	
pMM309		pKS(-):ccre2-In3-ccre2	<i>bla</i>	



## MATERIAL

Vektor	Aliasname	Charakteristische Merkmale	<i>E. coli</i> Marker	<i>C. reinhardtii</i> Marker
pMM314	<b>pCR-cCreIn</b>	pGEM: <i>ccre1-In1-ccre2</i>	<i>bla</i>	
pMM315		pGEM: <i>ccre1-In1-ccre2-In2</i>	<i>bla</i>	
pMM317		pSI: <i>ccre1-In1-ccre2-In2</i> (codonoptimiertes <i>ccre</i> -Gen mit Introns = <i>ccreIn</i> )	<i>bla</i>	ARG7.8
pMM354		pMM202/ <i>SmaI</i> -religiert ( <i>loxP</i> )	<i>bla</i>	
pMM355	<b>pCR-BleInCre</b>	pMM203/ <i>SmaI</i> ( <i>loxGA</i> )	<i>bla</i>	
pMM356		pMM206/ <i>SmaI</i> ( <i>loxAC</i> )	<i>bla</i>	
pMM366		wie pMM146 mit <i>bleIn-cre</i>	<i>bla</i>	<i>ble</i>
pMM367		wie pMM150 mit <i>bleInl-cre</i>	<i>bla</i>	<i>ble</i>
pMM370	<b>pCR-BleInLCre</b>	pUC18: <i>SalI</i> -Insert aus pMM315	<i>bla</i>	
pMM372		pMM370: <i>NaeI/SpeI</i> -Insert Punktmutaion für inaktive <i>ccre</i> *	<i>bla</i>	
pMM373		pMM315: <i>XhoI/SalI-ble-ccreIn</i> -Teil ("overlap" pMM146:315, Punktmutation Base*60 auf <i>ccre</i> -Teil, Aspartat bleibt)	<i>bla</i>	
pMM375		pMM315: <i>XhoI/SalI-blel-ccreIn</i> -Teil ("overlap" 150:315)	<i>bla</i>	
pMM377		pMM373: <i>SalI</i> -Insert aus pMM315 ( <i>ble-ccreIn</i> ) (B*60 auf <i>ccre</i> -Teil)	<i>bla</i>	
pMM378		pMM375: <i>SalI</i> -Insert aus pMM315 ( <i>blel-ccreIn</i> )	<i>bla</i>	
pMM379		pMM373 (B*60): <i>SalI</i> -Insert aus pMM372 ( <i>ble-ccreIn</i> *)	<i>bla</i>	
pMM380		pMM375: <i>SalI</i> -Insert aus pMM372 ( <i>blel-ccreIn</i> *)	<i>bla</i>	
pMM384	<b>pCR-BlecCreIn</b>	pXX37: <i>XhoI/BamHI-ble-ccreIn</i> (B*60)	<i>bla</i>	<i>ble</i>
pMM385	<b>pCR-BleLcCreIn</b>	pXX37: <i>XhoI/BamHI-blel-ccreIn</i>	<i>bla</i>	<i>ble</i>
pMM386	<b>pCR-BleIncCreIn</b>	pXX37: <i>FseI/BamHI-bleIn-ccreIn</i> (B*60)	<i>bla</i>	<i>ble</i>
pMM387	<b>pCR-BleInLcCreIn</b>	pXX37: <i>FseI/BamHI-bleInl-ccreIn</i>	<i>bla</i>	<i>ble</i>
pMM389	<b>pCR-BlecCreIn*</b>	pXX37: <i>XhoI/BamHI-ble-ccreIn</i> * (B*60)	<i>bla</i>	<i>ble</i>
pMM390	<b>pCR-BleLcCreIn*</b>	pXX37: <i>XhoI/BamHI-blel-ccreIn</i> *	<i>bla</i>	<i>ble</i>
pMM391	<b>pCR-BleIncCreIn*</b>	pXX37: <i>FseI/BamHI-bleIn-ccreIn</i> * (B*60)	<i>bla</i>	<i>ble</i>
pMM392	<b>pCR-BleInLcCreIn*</b>	pXX37: <i>FseI/BamHI-bleInl-ccreIn</i> *	<i>bla</i>	<i>ble</i>
pMM408	<b>pCR-cCreIn*</b>	pSI- <i>ccre</i> * mit Pkt.-mut. sonst wie pMM317	<i>bla</i>	ARG7.8
pMM409		pGEM: <i>ccre1+2</i> ohne <i>In</i>	<i>bla</i>	

## MATERIAL

Vektor	Aliasname	Charakteristische Merkmale	<i>E. coli</i> Marker	<i>C. reinhardtii</i> Marker
pMM410	<b>pCR-cCre</b>	pSI: <i>ccre</i> 1+2 ohne <i>In</i>	<i>bla</i>	<i>ARG7.8</i>
pMM411		pGEM: <i>Sma</i> I/ <i>Bam</i> HI- <i>ccre</i> *1+2 ohne <i>In</i>	<i>bla</i>	
pMM413		pSI: <i>ccre</i> *1+2 ohne <i>In</i>	<i>bla</i>	<i>ARG7.8</i>
pMM414		pMM161:317 <i>Xho</i> I/ <i>Nco</i> I- <i>ccreIn</i> hinter <i>loxP</i>	<i>bla</i>	
pMM415	<b>pCR-cCrexInloxP-Aph</b>	pMM161:413 <i>Xho</i> I/ <i>Nco</i> I- <i>ccre</i> * hinter <i>loxP</i>	<i>bla</i>	
pMM416		pMM198:414 <i>Xba</i> I/ <i>Sac</i> I- <i>ccre</i> mit <i>In</i> 2+3 zwischen <i>loxP</i> und vor <i>aphVIII</i>	<i>bla</i>	<i>aphVIII</i>
pMM417		pMM198:415 <i>Xba</i> I/ <i>Sac</i> I- <i>ccre</i> * zwischen <i>loxP</i> und vor <i>aphVIII</i>	<i>bla</i>	<i>aphVIII</i>
pMM437		pMM162:317 <i>Xho</i> I/ <i>Nco</i> I- <i>ccre In</i> 2+3 hinter <i>loxAC</i>	<i>bla</i>	
pMM438	<b>pCR-cCrexInloxGA-Aph</b>	pMM163:317 <i>Xho</i> I/ <i>Nco</i> I- <i>ccre</i> mit <i>In</i> 2+3 hinter <i>loxGA</i>	<i>bla</i>	
pMM439		pMM199:438 <i>Xba</i> I/ <i>Sac</i> I- <i>ccre</i> mit <i>In</i> 2+3 zwischen <i>loxGA</i> und vor <i>aphVIII</i>	<i>bla</i>	<i>aphVIII</i>
pMM440		pMM204:437 <i>Xba</i> I/ <i>Sac</i> I <i>ccre</i> mit <i>In</i> 2+3 zwischen <i>loxAC</i> und vor <i>aphVIII</i>	<i>bla</i>	<i>aphVIII</i>

## 6 METHODEN

### 6.1 Kulturzucht

#### 6.1.1 Anzucht und Lagerung von *E. coli*

Einzelne Kolonien wurden mit einem sterilen Zahnstocher von der Agar-Platte gepickt und in LB<sub>Amp/Kana</sub>- bzw. 2xYT<sub>Amp/Kana</sub>-Flüssigkultur über Nacht bei 37°C unter Schütteln bei 200rpm inkubiert. Nach Erreichen einer optischen Dichte von OD<sub>578</sub>  $\cong$  1 betrug die Kulturdichte ca.  $1 \cdot 10^9$  Zellen/ml. Zur kurzfristigen Lagerung wurden geeignete Transformanten als Einzelkolonien auf LB<sub>Amp/Kana</sub>-Platten kultiviert.

#### 6.1.2 Kryokonservierung von *E. coli*

Zur Langzeitlagerung wurden 800µl der Kultur mit 200µl sterilem 87%igen Glycerin vermischt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Glycerinkulturen wurden bei –80°C aufbewahrt.

#### 6.1.3 Kultivierung und Lagerung von *C. reinhardtii*

Zu Analyse Zwecken wurden die *C. reinhardtii*-Stämme in TAP-Flüssigmedium (Zugabe von Arginin ad 100µg/ml bei argininauxotrophen Stämmen) bei 26°C und Dauerlicht kultiviert. Schüttelkulturen wurden zusätzlich bei 1300rpm inkubiert. Das Kulturvolumen richtete sich nach der jeweiligen Verwendungsart (siehe Tab. 6.1-a).

Gefäß/ Kulturvolumen	Verwendungsart
Kölbchen/ 25-50ml	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Kurzzeitlagerung</li> <li>✓ Transformation</li> </ul>
24Well-Platten/ a 2ml	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Isolierung genomischer DNA für Southern Blot-Analyse und PCR-Reaktion</li> <li>✓ Proteinanalyse für SDS-PAGE, Western Blot</li> </ul>
96-Well-Platten/a 0,2ml	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ PCR-Screening</li> <li>✓ Messung der Luciferaseaktivität</li> <li>✓ Reporterassays mit Selektionsmarkern</li> </ul>

Tab. 6.1-a Kultivierungsart von *C. reinhardtii*.

Zum Überimpfen wurden gut angewachsene Kulturen (ca.  $2 \cdot 5 \cdot 10^6$  Zellen/ml) im Verhältnis von 1/50 bis 1/100 in frisches Medium überführt. Für eine Lagerung von 4-6 Wochen wurden

die Zellen auf TAP-Agarplatten (Zugabe von Arginin nach Bedarf) ausplattiert und bei 22°C im Dauerlicht kultiviert.

### 6.1.4 Bestimmung der Zellzahl

#### Neubauer-Zählkammer

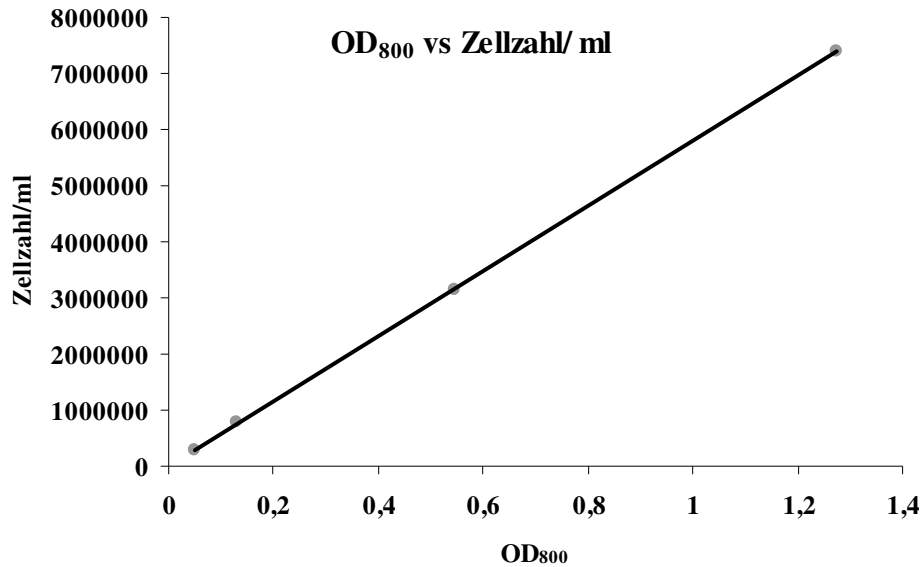
Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Infolge der Kapillarkräfte wurden insgesamt 20µl in die Kammer aufgenommen. Für weniger mobile Stämme wie den *cw15Arg<sup>-</sup>A* wurde direkt die unverdünnte Schüttelkultur eingesetzt, bei beweglicheren Zellen wie dem *cw15<sup>+</sup>* wurde vorher eine 1:1 Verdünnung mit Formaldehyd hergestellt. Dessen toxische Wirkung führte zur Immobilisierung der Algen und erleichterte so das Zählen. Zur Ermittlung der Zellzahl wurden 5 mittlere, nicht nebeneinander liegende Quadrate (jedes mittlere Quadrat enthielt 16 Kleinstquadrate) ausgewertet. Die Gesamtzellzahl/ µl Kultur ergab sich aus folgender Gleichung:

$$\text{Gesamtzellzahl/ } \mu\text{l} = Z \cdot F / n \cdot V$$

mit Z = gezählte Zellzahl, F = Verdünnungsfaktor, n = Zahl der ausgezählten Kleinstquadrate, V = Volumen eines Kleinstquadrates

#### Absorptionsmessung bei OD<sub>800</sub>

Zur schnellen Abschätzung der Zellzahl vieler Proben zu einem definierten Zeitpunkt wurde die optische Dichte der Kulturen photometrisch bei 800nm bestimmt. Bei dieser Wellenlänge findet keine Absorption mehr durch *C. reinhardtii*-eigene Pigmentsysteme statt. Aus dem linearen Zusammenhang zwischen Absorption und Zellzahl (siehe Abb. 6.1-a) konnte durch Messung der OD<sub>800</sub> die Zellzahl bestimmt werden. Die Messung erfolgte mit 1ml Kultur gegen TAP als Referenz. Für Kulturen, deren OD<sub>800</sub>>0,9 war, wurde die Kultur vor der Messung 1:1 mit TAP-Medium verdünnt und dann vermessen.



**Abb. 6.1-a Linearer Zusammenhang Zellzahl vs OD<sub>800</sub>.** Die photometrische Messung bei 800nm und die Bestimmung der Zellzahl mit *C. reinhardtii*-Kulturen in TAP-Medium zur Erstellung der Kalibriergeraden erfolgte durch Frau Dr. Eichler-Stahlberg (KFB Regensburg).

#### 6.1.5 Kryokonservierung von *C. reinhardtii*

Die Kryokonservierung der *C. reinhardtii*-Kulturen wurde durch Dr. Christoph Griesbeck nach dem Protokoll von Dick Sayre (<http://www.chlamy.org.methods/freezing.html>) vorgenommen. Die Kulturen wurden in TAP-Medium (Argininzugabe nach Bedarf) bis zu einer Zelldichte von  $1 \cdot 10^6$  Zellen/ml inkubiert. Die Zellen wurden für 5min bei 2500rpm abzentrifugiert und das Pellet in 1/10V frischem Medium resuspendiert. Davon wurden 250µl konzentrierte Zellsuspension entnommen und mit 250µl TAP + 6% Methanol vermischt. Die Proben wurden in einen mit Isopropanol gefüllten Kryobehälter gestellt. Nach ca. 65min bei -80°C hatte das Isopropanolbad eine Temperatur von -40°C erreicht, die Kulturen wurden dann in flüssigem Stickstoff eingefroren und ebenso gelagert.

#### 6.1.6 Auftauen von kryokonservierten *C. reinhardtii*

Das Auftauen der Proben wurde ebenfalls von Dr. Christoph Griesbeck vorgenommen. Die kryokonservierten Kulturen wurden für 2min bei 35°C aufgetaut und in 10ml TAP (Argininzugabe nach Bedarf) überführt. Die Zellen schüttelten für 6 bis 18h und wurden anschließend auf Platten mit geeignetem Medium ausplattiert.

## 6.2 Transformationsmethoden

### 6.2.1 Herstellung kompetenter *E. coli*

Die Methode von Hanahan (59) wurde zur Herstellung kompetenter Zellen verwendet. Dafür wurden 350µl einer 5ml SOB-Vorkultur (ÜN) zum Animpfen einer 50ml SOB-Hauptkultur verwendet. Diese wurde unter Schütteln bei 37°C und 200rpm bis zu einer OD<sub>578</sub> von 0,3 bis 0,4 inkubiert. Nach der Zentrifugation bei 24000rpm für 15min wurden die Zellen in 15ml vorgekühltem TBFI-Puffer resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde für 10min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen ein weiteres Mal bei 2000rpm für 5min abzentrifugiert. Das Pellet wurde durch vorsichtiges Schwenken auf Eiswasser in 1,8ml TBFI-Puffer resuspendiert, zu jeweils 110µl auf N<sub>2</sub>fl. aliquotiert und anschließend bei -80°C gelagert.

### 6.2.2 Transformation von kompetenten *E. coli*

Für die Aufnahme der DNA wurden 50µl kompetente Zellen mit 10-15µl des Ligationsansatzes nach dem Protokoll (137) transformiert. Nach 20min Inkubation auf Eis wurden die Ansätze einem Hitzeschock bei 42°C für 90s unterzogen. Nach 2 bis 3min bei 0°C wurden sie mit 500µl SOC-Medium versetzt und für 45min bei 37°C und 400rpm geschüttelt. Die Transformationsansätze wurden dann entsprechend der Selektion auf LB<sub>Amp/Kana</sub>-Platten verteilt. Nach 12-16h Inkubation bei 37°C wurden Transformanten als Einzelkolonien erhalten.

### 6.2.3 Transformation von *C. reinhardtii*

Die Einführung der DNA erfolgte mittels Glaskügelchen-Methode (78). Für die Transformation wurden die Algen in 50ml Flüssigkulturen bis zu einer Zelldichte von 1-6·10<sup>6</sup> Zellen/ml bzw. einer OD<sub>800</sub> von 0,4-1,0 gezüchtet. Durch Zentrifugation für 5min bei 2000rpm wurde die Kultur pelletiert und zur Aufkonzentrierung in frischem TAP resuspendiert. Die Endkonzentration der Zellen pro Ansatz betrug ca. 1-2·10<sup>8</sup> Zellen/ml. Für jede Transformation wurden 300µl Algen, 100µl 20% PEG6000, 300mg Glaskügelchen und ca. 200-500ng *ScaI* linearisierte Plasmid-DNA eingesetzt. Der Ansatz wurde dann 15s bei 70% der Maximalgeschwindigkeit des Vortex-Schüttlers gemischt. Durch die mechanische Beanspruchung der Zellen sind die Zellwände durchlässig geworden, was die Aufnahme von DNA ermöglichte. In Abhängigkeit vom Selektionsmarker wurden die transformierten Zellen direkt auf den TAP-Platten unter entsprechendem Selektionsdruck ausplattiert (z.B. bei Erlangen von Argininprototrophie). Wenn dagegen die Selektion durch die Einführung eines

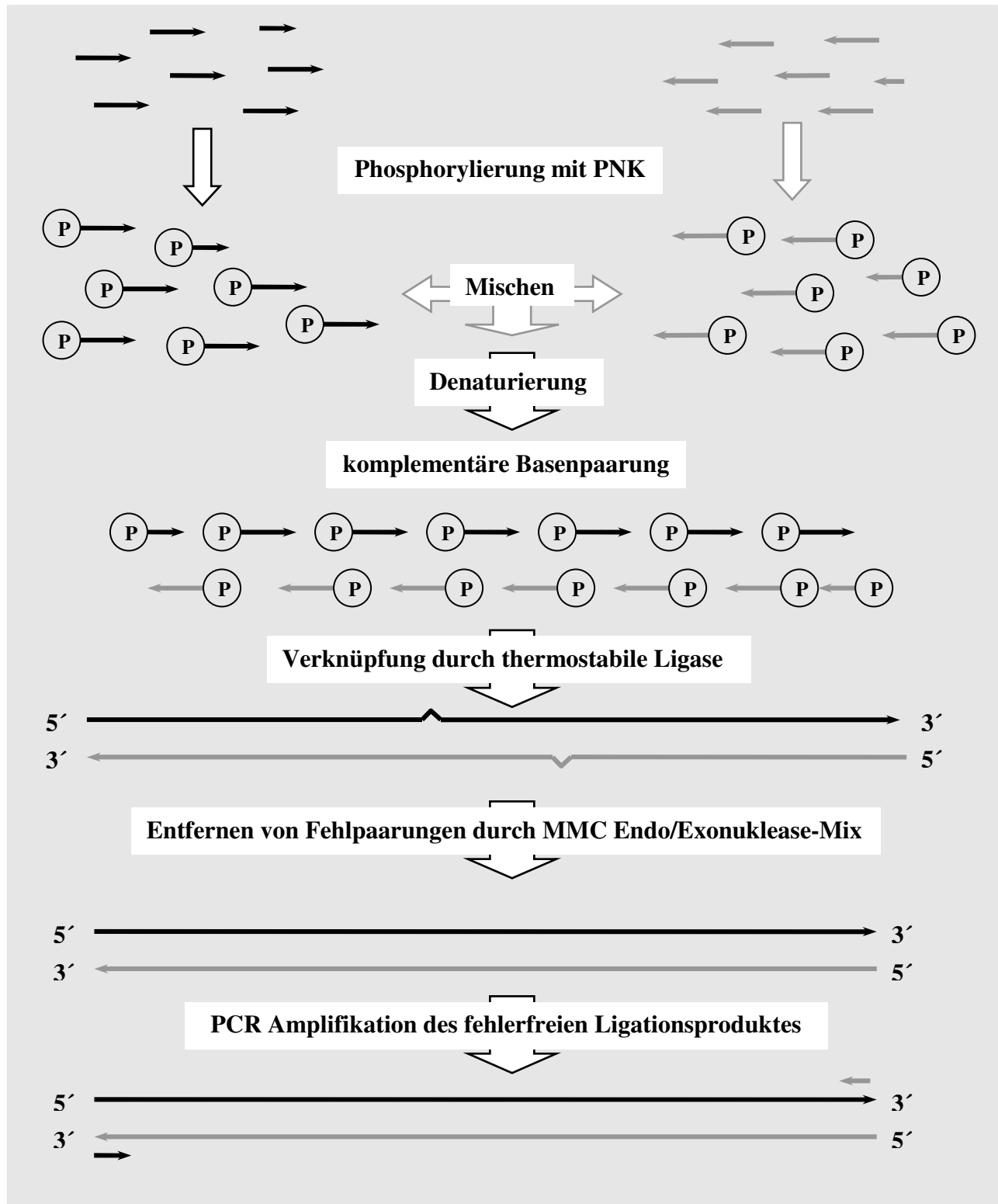
Resistenzgens, (*ble*, *aphVIII*) erfolgte, wurden die transformierten Zellen für 7-24h in Flüssigmedium ohne Selektionsdruck inkubiert. Die Transformationsansätze wurden dann nach Zentrifugation bei 2000rpm für 5min pelletiert, in einem Gesamtvolumen von 1200µl frischem Medium resuspendiert und auf den entsprechenden Platten unter Selektionsdruck verteilt. Die Inkubation erfolgte unter Licht bei RT. Die ersten Kolonien waren nach ca. 6-8 Tagen zu erkennen.

### 6.3 Molekularbiologische Methoden

#### 6.3.1 Gensynthese

Das hierbei verwendete Verfahren zur Gensynthese basiert auf dem Prinzip der Doppelstranggensynthese wobei Oligonukleotide unter Verwendung thermostabiler Ligasen miteinander verknüpft werden (42). Mit Hilfe der Software „OligoCreator“ (KFB Regensburg) wird die gewünschte Proteinsequenz in die Gensequenz rückübersetzt, dabei verwendet das Programm automatisch die am häufigst verwendeten Codons des gesuchten Organismus. Des Weiteren können bestimmte Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme ausgeschlossen werden, was für weitere Klonierungsschritte von Bedeutung ist. Die Gensequenz des gesamten Gensyntheseproduktes wird dann in die einzelnen Oligonukleotiden (40 bis 60 Basen lang) aufgeteilt. Unter optimalen Bedingungen bilden die überlappenden Bereiche der Vorwärts- und Rückwärtsoligonukleotide Hybride, welche bei Temperaturen zwischen 60-70°C stabil sind. Die endständigen Oligonukleotide sind kürzer, sie dienen in einem späteren Schritt der PCR-Amplifikation für das gesamte Produkt.

Die Synthese wurde nach dem Protokoll vom GeneBuilder-Kit (77) durchgeführt. In Abb. 6.3-a ist die Durchführung schematisch dargestellt.



**Abb. 6.3-a Prinzip der Doppelstrangsynthese.** Die Vorwärtsoligonukleotide sind als schwarze und die Rückwärtsoligonukleotide als graue Pfeile dargestellt. Das jeweilige Oligonukleotidgemisch wird phosphoryliert (Phosphat-Rest = eingekreistes P), beide Ansätze gemischt und bei 95°C denaturiert. Beim Abkühlen lagern sich die Oligonukleotide aufgrund der komplementären Basenpaarung zusammen. Die hitzestabile Taq-DNA-Ligase verknüpft das 5'-PO<sub>4</sub>-Ende mit dem nächsten freien 3'-OH-Ende. Durch wiederholte Denaturierungs- und Renaturierungsschritte werden fehlgepaarte Oligonukleotide wieder gelöst. Das Ligationsprodukt wird zur weiteren Fehlerkorrektur mit einem MMC Endo/Exonuklease-Mix behandelt und abschließend mit den äußeren Oligonukleotiden in einer PCR-Reaktion amplifiziert.



### 6.3.2 Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren

Die Isolierung der Nukleinsäuren erfolgte, wenn nicht anders beschrieben, mit Hilfe eines Kits nach dem Protokoll des jeweiligen Herstellers. Die Lagerung der DNA erfolgte, wenn nicht anders angegeben, bei -20°C.

#### 6.3.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Plasmid-DNA wurde aus 2-4ml 2xYT<sub>Amp/Kana</sub>-Flüssigkultur nach der Vorschrift des NucleoSpin® Plasmid-Kits von (97) isoliert.

#### 6.3.2.2 Isolierung von genomischer DNA aus *C. reinhardtii*

Zu Beginn der Arbeit wurde die Isolierung der genomischen DNA mit dem *DNeasy*<sup>TM</sup> Plant Mini Kit von Qiagen durchgeführt. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers (124). Da es sich hier um zellwanddefekte Algen handelte, wurden die Zellen ohne weitere Vorbehandlung aus einer 2ml Kultur der OD<sub>800</sub>≈0,5 durch Zentrifugation pelletiert. Das Zellmaterial wurde chemisch lysiert und mit Hilfe von Säulchen aufgereinigt.

Die Aufreinigung mit dem Wizard® Genomic DNA Purification Kit von Promega (123) hat sich als die effektivere Methode zur DNA-Isolierung erwiesen, da bei gleicher Kulturdichte eine höhere Ausbeute erreicht werden konnte. Hierfür wurden ca.  $1 \cdot 10^7$  Zellen/ml einer dicht angewachsenen Kultur für 10min bei 2000rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 500µl 1xPBS gewaschen und die Suspension wiederholt zentrifugiert, anschließend wurde der Überstand möglichst vollständig entfernt. Die Lyse der Zellen erfolgte in 200µl „Nuclei Lysis Solution“ durch Resuspendieren und Einfrieren bei -80°C. Die Suspension taute bei RT auf und inkubierte dann bei 65°C für 15min. Der Reaktionsansatz kühlte auf RT ab, die freigesetzte RNA wurde durch eine RNaseA-Behandlung bei 37°C für 15min abgebaut. Nach Zugabe von 84µl „Protein Precipitation Solution“ wurde die Mischung erneut für 20min und 13000rpm abzentrifugiert, um die gefällten Proteine zu pelletieren. Der Überstand mit der DNA wurde in ein neues ERG überführt, die DNA mit 240µl Isopropanol für 5min bei RT gefällt und für 10min bei 134000rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 600µl eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen, erneut abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und an der Luft getrocknet. Zum Lösen der DNA wurde das Pellet für 1h bei 65°C in ddH<sub>2</sub>O gelöst. Das vollständige Quellen und die Lagerung der genomischen DNA erfolgten bei 4°C.

### 6.3.2.3 Herstellung von *C. reinhardtii*-Lysat für die PCR-Reaktion

Das Lysat der *C. reinhardtii*-Kulturen wurde im Wesentlichen nach dem gleichen Protokoll durchgeführt wie für *Volvox carteri* (58). Die Präparation erfolgte aus einer 96Well-Kulturplatte. Es wurden jeweils 100µl der Algen mit der Mehrkanalpipette in eine PCR-Platte von Abgene überführt. Die Zellen wurden für 10min bei 2000rpm abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in je 10µl heißem Lysepuffer (0,1M NaOH, 2M NaCl und 0,5% SDS, 95°C) resuspendiert. Die Suspension wurde für 5min bei 95°C in der PCR-Maschine denaturiert. Die aufgeschlossenen Zellen wurden dann mit 100µl 50mM Tris/HCl (pH= 7,5) neutralisiert und der gesamte Ansatz für 10min bei 2000rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgenommen und zu weiteren 100µl 50mM Tris/HCl (pH= 7,5) in eine frische 96Well-Platte gegeben. Je 5µl des Lysates dienten als Matrize für die PCR-Reaktion.

### 6.3.2.4 Auftrennung von DNA mittels Gelelektrophorese

Zum analytischen und präparativen Auftrennen von Plasmiden, genomischer DNA und PCR-Produkten wurden 1-2%ige Agarosegele in TAE-Puffer verwendet. Die DNA-Moleküle wandern im elektrischen Feld wegen der negativ geladenen Phosphatgruppen im Desoxyribose-Phosphat-Rückgrat zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit wird beeinflusst durch die Molekülgröße, die Konformation der DNA, die Agarosekonzentration und die angelegte Gleichspannung. Für optimale Trennergebnisse wurde eine Spannung von 80-120V (8-10V/cm) gewählt. Zur Detektion der DNA wurde den Gelen Ethidiumbromid (ad 1µg/ml), welches in die Doppelhelix interkaliert, zugesetzt. Unter UV-Licht bei 254nm fluoresziert das Ethidiumbromid und die Banden werden sichtbar.

### 6.3.2.5 Aufreinigung von DNA

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus der Lösung sowie aus Agarosegelen erfolgte nach dem Protokoll des NucleoSpin® Extract II-Kit (96).

### 6.3.2.6 Konzentrationsbestimmung von gelöster DNA

Die Messung der DNA-Konzentration erfolgte in einer Quarzküvette (d= 1cm) spektralphotometrisch, dabei wird die Eigenschaft der DNA genutzt, bei 260nm Licht zu absorbieren. Im Bereich der  $OD_{260} = 0,1-1$  besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der DNA-Konzentration und der Absorption des Lichtes. Für doppelsträngige DNA beträgt die Konzentration 50ng/µl (in ddH<sub>2</sub>O) bei einer  $OD_{260} = 1$ . Somit lassen sich DNA-Lösungen

unbekannter Menge im genannten Absorptionsbereich bestimmen. Für die Messung wurde eine 1/80 Verdünnung der Probe in ddH<sub>2</sub>O gegen die Referenz ddH<sub>2</sub>O eingesetzt. Die Auswertung erfolgte automatisch durch die entsprechende Software des Spektralphotometers. Zur einfachen Abschätzung der Konzentration wurde die DNA auf ein mit Ethidiumbromid gefärbtes Gel aufgetragen, gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit einem DNA-Standard bekannter Konzentration verglichen.

### **6.3.3 Enzymatische Reaktionen mit DNA**

#### **6.3.3.1 Restriktionsverdau**

##### **Verdau mit einem Restriktionsenzym**

Die DNA wurde für den quantitativen Restriktionsverdau mit einem dreifachen Überschuss des Enzymes in dem entsprechenden Puffer für 3h bis ÜN bei 37°C (Ausnahme *Sma*I 30°C) in einem 50µl Ansatz inkubiert.

##### **Verdau mit zwei Restriktionsenzymen**

Die DNA wurde in dem Puffer, in welchem beide Enzyme mit über 75% Wahrscheinlichkeit schneiden, verdaut. Wenn kein geeigneter Puffer vorhanden war, wurde die DNA zuerst mit dem einen Restriktionsenzym verdaut und dann der Reaktionsansatz direkt aus der Lösung mit dem NucleoSpin<sup>®</sup> ExtractII Kit von Machery&Nagel aufgereinigt. Anschließend erfolgte der Verdau mit dem zweiten Enzym.

##### **Analytischer Restriktionsverdau**

Zur Analyse von klonierten DNA-Fragmenten wurden ein entsprechender 10µl Ansatz für 1h bei 37°C inkubiert.

#### **6.3.3.2 Dephosphorylierung**

Um eine Religation des verdauten Plasmids bei der Klonierung zu reduzieren, wurde nach dem Restriktionsverdau das 5'-terminal phosphorylierte Ende mittels alkalischer Phosphatase (CIP, SAP) entfernt. Nach Zugabe von 1U des Enzyms, wurde der Reaktionsansatz bei 37°C für 30 min inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte entweder bei der Aufreinigung der DNA aus der Lösung oder aus dem Agarosegel mit dem NucleoSpin<sup>®</sup> ExtractII Kit (96).

### 6.3.3.3 Ligation

Mit Hilfe der T4-DNA-Ligase wurde das Insert mit dem Vektor verknüpft, indem diese eine kovalente Bindung zwischen dem 5'-Phosphat am Ende des einen Stranges mit dem 3'-Hydroxy-Ende des benachbarten Stranges bildet. Die Reaktion wurde abhängig von der Art der Enden, überhängend oder glatt, nach dem Protokoll von Fermentas im 15µl Ansatz bei 22°C durchgeführt.

Alternativ wurde zur Integration von PCR-Produkten mit Adenosin-Überhang (bedingt durch die Amplifikation mit der Taq-Polymerase) der pGEM®-T Vektor verwendet. Das System von Promega verwendet einen mit *EcoRV* glatt geschnittenen Vektor, welcher zusätzlich an den 3'-Enden mit einen Thymidin-Rest versehen wurde. Die komplementären Überhänge stabilisieren das Ligationsprodukt und verbessern so die Ausbeute. Die Ligation erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers (122).

### 6.3.3.4 Phosphorylierung von DNA

Die T4-Polynukleotidkinase (T4-PNK) katalysiert den Transfer eines Phosphat-Rests vom ATP auf das 5'-Hydroxy-Ende von einzel-oder doppelsträngiger DNA. Doppelsträngige DNA-Fragmente wurde in Anwesenheit von 1,25mM ATP, 10U T4-PNK in 1x PNK-Puffer in einem 20µl Ansatz für 1h bei 37°C inkubiert. Die T4-PNK wurde anschließend 20min bei 65°C inaktiviert.

### 6.3.3.5 Phosphorylierung von Oligonukleotiden

Für die Phosphorylierung der Oligonukleotide wurden jeweils 250pmol des Vorwärtsnukleotids und Rückwärtsnukleotids in Anwesenheit von 25nmol ATP im Reaktionspuffer mit 10U T4-PNK versetzt und 1h bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte bei 65°C für 20min.

### 6.3.3.6 Hybridisierung von Oligonukleotiden

Die phosphorylierten Oligonukleotide wurden für 5 min bei 95°C im Metallheizblock denaturiert, anschließend wurde der Block von dem Heizelement getrennt und langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Dabei erfolgte die Hybridisierung der komplementären Vorwärts- und Rückwärtsoligonukleotide.

### 6.3.3.7 Klenow-Reaktion

Das Klenow-Fragment ist die große Untereinheit der DNA-Polymerase I aus *E. coli*. Das Enzym katalysiert den Einbau von Nukleotiden von 5'→3' durch seine Polymeraseaktivität, und fungiert gleichzeitig von 3'→5' als Exonuklease, um Fehlpaarungen bei der Synthese des komplementären Stranges zu korrigieren. Aufgrund dieser Eigenschaften wurde das Klenow-Fragment zum Auffüllen überstehender Enden, welche durch Restriktionsverdau entstanden waren, verwendet. Die geschnittene und aufgereinigte DNA wurde in Anwesenheit von 100µM dNTPs, 1x Klenow-Puffer und 1U Klenow-Fragment in einem 50µl Reaktionsansatz für 15min bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte entweder mittels Gelelektrophorese oder durch Hitzeinaktivierung für 10min bei 70°C.

### 6.3.3.8 Ortsgerichtete Rekombination

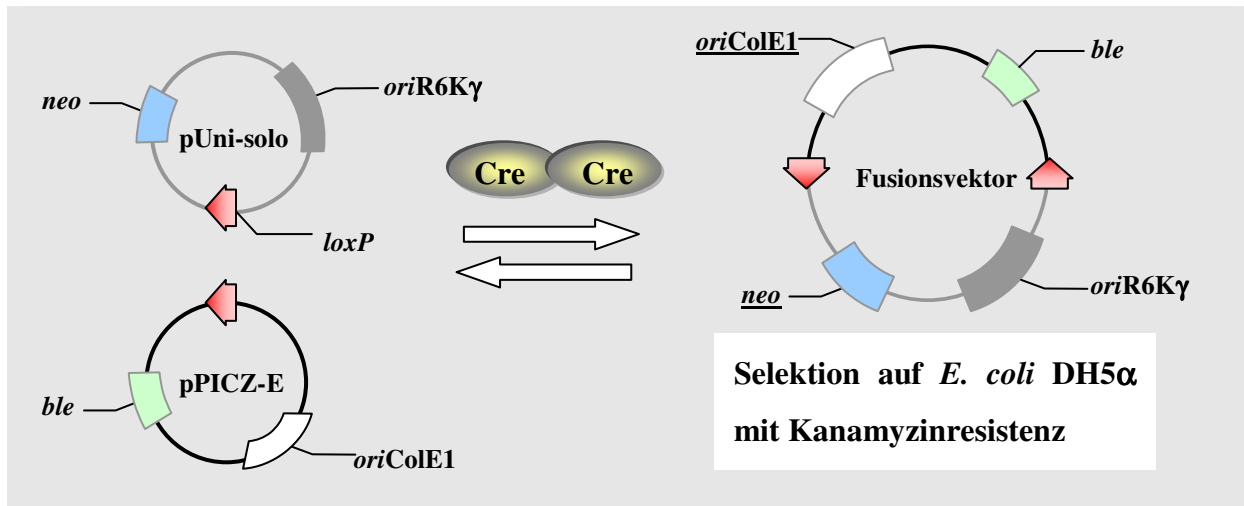
Die Cre-Rekombinase (siehe auch 2.3.3) aus dem Bakteriophagen P1 katalysiert die ortsgerichtete Rekombination von DNA zwischen *loxP*-Erkennungssequenzen. Die Art der Rekombinationsprodukte hängt dabei von der Lokalisation und der Orientierung der Erkennungssequenzen ab.

#### 6.3.3.8.1 *In vitro* Rekombinationsassay in *E. coli*

##### Aktivitätstest für die Cre-Rekombinase

Der *in vitro* Rekombinationsassay beruht auf der Fusion zweier *loxP*-Plasmide vermittelt durch die Cre-Rekombinase. Das Protokoll wurde abgewandelt nach Liu et al. (91). Der Uni-Vektor (pUni-solo) enthielt, zusätzlich zur *loxP*-Sequenz, das Kanamycinresistenzgen (*neo*) und den Replikationsursprung *oriR6Kγ* (*ori* = “origin of replication“). *E. coli* PIR1-Zellen, welche das *pir*-Gen exprimieren, können das Plasmid unter Selektion auf Kanamycin vermehren. Der Rezipientenvektor (pPICZ-E) enthielt dagegen den *oriColE1* (zur Replikation in DH5α) sowie das *ble*-Gen für Zeozinresistenz.

Die Fusion der beiden Plasmide durch die Cre-Rekombinase erfolgte in 1x Rekombinationspuffer für 30min bei 37°C. Die Plasmidkonzentration musste empirisch in einem Vorversuch mit 1U einer kommerziellen Cre-Rekombinase (Fa. NEB) überprüft werden. Die Hitzeinaktivierung der Rekombinase erfolgte für 10min bei 65°C. Der resultierende Fusionsvektor wurde dann in kompetente *E. coli* DH5α transformiert und die Transformanten auf LB<sub>Kana</sub> (30µg/ml) selektiert (siehe Abb. 6.3-b).



**Abb. 6.3-b Aktivitätstest für die Cre-Rekombinase.** Die Rekombination der Plasmide pUni-solo und pPICZ-E durch das Cre-Enzym führt zu dem Fusionsvektor.

### Funktionstest für Plasmide mit *lox*-Sequenzen

Plasmide, die zwei *lox*-Erkennungssequenzen in direkter Orientierung zueinander hatten, wurden im zellfreien System für 30min bei 37°C in 1xRekombinationspuffer mit 1U Cre-Rekombinase (Fa. NEB) inkubiert, 15min bei 65°C hitzeinaktiviert und auf die erfolgte Rekombination überprüft. Als Negativkontrolle wurde der gleiche Reaktionsansatz mit ddH<sub>2</sub>O anstatt der Cre-Rekombinase durchgeführt.

#### 6.3.3.9 Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction = PCR) können definierte DNA-Bereiche vervielfältigt werden. Dafür werden zwei Oligonukleotide (Primer), welche komplementär homolog zu dem einen Strang des einen Endes und zu dem anderen Strang des anderen Endes der zu vervielfältigenden DNA-Region sind, eingesetzt. Nach der Denaturierung der DNA können sich die Primer bei der abschließenden Abkühlung des Reaktionsansatzes an die DNA-Matrize anlagern. Eine thermostabile Polymerase synthetisiert ausgehend vom 3'-Hydroxy-Ende des Oligonukleotids durch Nukleotidveresterung den neuen DNA-Strang. Die Orientierung der Oligonukleotide muss so gewählt werden, dass die neu gebildeten Stränge aufeinander zulaufen. Nachdem die gewünschte Sequenz synthetisiert ist, wird der Zyklus in den nachfolgenden Reaktionsschritten für 30-40-mal wiederholt:

- 1) Trennung der doppelsträngigen Matrizen-DNA (95°C)
- 2) Anlagerung der Oligonukleotide an die homologen Bereiche der zu vervielfältigen DNA (40-70°C, abhängig von der Zusammensetzung der Oligonukleotide)
- 3) Verlängerung der Oligonukleotide beim Temperaturoptimum der Polymerase (z.B. Taq-Polymerase; ca.2800 Basen/min bei 72°C, siehe auch Tab. 6.3-a)

Zwei zusätzliche Reaktionsschritte werden nur einmal durchgeführt; vor Beginn der Zyklen eine vollständige Denaturierung der DNA bei 95°C und zum Schluss eine Phase von 5-7min bei 72°C zur Beendigung aller begonnenen Polymerisationen.

Für die PCR-Reaktion wurde aus den entsprechenden Lösungen ein Mastermix der folgenden Endkonzentration hergestellt: 1 pmol je Oligonukleotid, 0,2mM dNTPs, 1x PCR-Puffer (enthält bereits 2,5mM MgCl<sub>2</sub> sowie Ladepuffer) und 1-2U der entsprechenden thermostabilen Polymerase. Die Gesamtmenge des Mastermixes war abhängig von der Anzahl der Reaktionsansätze. Nach Zugabe der Matrizen-DNA (0,01-1ng Plasmid-DNA bzw. 0,1-1µg genomische DNA pro 50µl Reaktionsansatz) wurde die Reaktion im Thermocycler entsprechend der jeweiligen Reaktionsbedingungen durchgeführt.

In Abhängigkeit von der weiteren Verwendung des PCR-Produktes wurden die folgenden thermostabilen Polymerasen eingesetzt.

Polymerase	Eigenschaften	Verwendung
Taq	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 5'→3' Polymeraseaktivität</li> <li>✓ 5'→3' Exonukleaseaktivität</li> <li>✓ hohe Syntheserate (bis 2800b/min)</li> <li>✓ templateunabhängiger Überhang (A)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Kolonie-PCR für <i>E. coli</i>- und <i>C. reinhardtii</i>-Transformanten</li> <li>✓ Alternative für Vent und HiFi bei zu geringer Prozessivität</li> </ul>
Vent	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 5'→3' Polymeraseaktivität</li> <li>✓ 5'→3' Exonukleaseaktivität</li> <li>✓ 3'→5' Exonukleaseaktivität</li> <li>✓ kein unspezifischer Überhang</li> <li>✓ geringe Prozessivität</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ PCR-Amplifikation von DNA-Bereichen für Klonierungen in glatt geschnittenen Vektoren (u.a. pKS/<i>SmaI</i>)</li> </ul>
HiFi	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Taq-/Tgo-Polymerase-Mix</li> <li>✓ 5'→3' Polymeraseaktivität</li> <li>✓ hohe Ausbeute</li> <li>✓ mit geringer Fehlerquote durch 3'→5' Exonuklease-Aktivität</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Klonierung glatt im pKS/<i>SmaI</i> oder</li> <li>✓ durch A-Überhang im pGEM-T möglich</li> </ul>

**Tab. 6.3-a Thermostabile Polymerasen, deren Eigenschaften und die Verwendung.**

### **6.3.3.9.1 „Nested“-PCR**

Bei sehr geringen DNA-Mengen wurde eine verschachtelte („nested“) PCR-Reaktion durchgeführt. Dafür dienten 5µl einer vorangegangenen PCR-Reaktion als Vorlage. Die Oligonukleotide wurden so gewählt, dass sie innerhalb des bereits amplifizierten Bereiches lagen.

### **6.3.3.9.2 Einführung von Restriktionsschnittstellen (Insertionsmutagenese)**

Mit Hilfe der Insertionsmutagenese können durch die Modifizierung der Oligonukleotide an ihrem 5'-Ende zusätzlich Restriktionsschnittstellen an die zu amplifizierende DNA-Sequenz eingefügt werden. Da viele Endonukleasen für ihre volle Aktivität „upstream“ und „downstream“ der Erkennungssequenz einige Basen benötigen, wurden noch zwei weitere Basen (z.B. AT) an das 5'-Ende des Oligonukleotids angefügt. Die aufgereinigten PCR-Produkte konnten dann mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und für weitere Klonierungsschritte verwendet werden.

### **6.3.3.9.3 „Overlap“-PCR**

Für die Verknüpfung von zwei separaten DNA-Sequenzen wurde die „overlap“-PCR eingesetzt. Durch die gezielte Anpassung der Oligonukleotide an die überlappenden Sequenzbereiche konnte das neue DNA-Fragment in drei PCR-Reaktionen synthetisiert werden. Das Prinzip ist in Abb. 6.3-c veranschaulicht. Für die erste PCR wurde zur Amplifikation von Sequenz A ein entsprechendes Vorwärtsoligonukleotid und ein Rückwärtsoligonukleotid, welches zusätzlich an dem 5'-Ende einen Teil von Sequenz B enthielt, verwendet. Parallel wurde in einer zweiten PCR-Reaktion mit einem Vorwärtsoligonukleotid, welches am 5'-Ende an die Sequenz A angepasst wurde, und einem Rückwärtsoligonukleotid die Sequenz B vervielfältigt. Die PCR-Produkte aus PCR1 und 2 wurden aus einem Agarosegel aufgereinigt und als Template für die dritte PCR eingesetzt. Die Länge der überlappenden Bereiche wurde so gewählt, dass die Schmelztemperatur des Hybrids mindestens 60°C betrug. Nach der erfolgreichen Hybridisierung der komplementären Stränge diente das jeweilige 3'-Ende als Primer für die Polymerase. Der Einbau der dNTPs führte zur Synthese der Sequenz AB. Die weitere Amplifikation des gesamten DNA-Bereiches erfolgte durch die äußeren Primer.



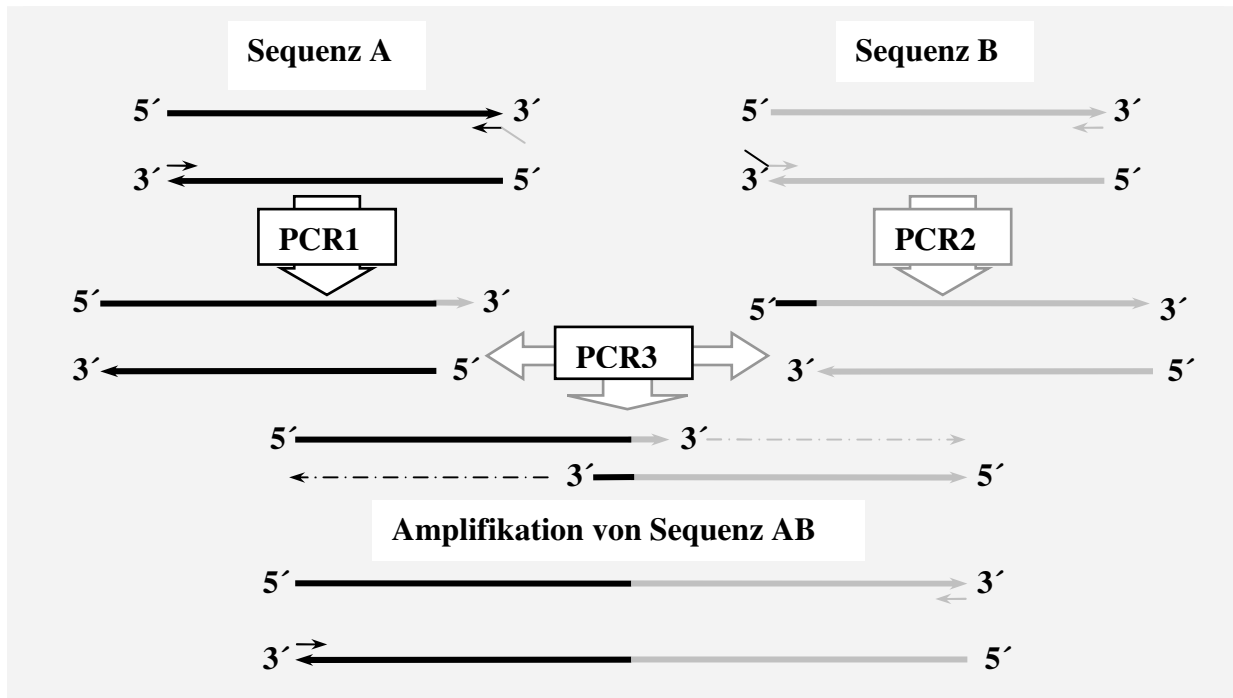


Abb. 6.3-c „Overlap-PCR“ zur Verknüpfung zwei separater DNA-Bereiche.

#### 6.3.3.9.4 Einführung einer Punktmutation (ortsgerichtete Mutagenese)

Für den Austausch einer Aminosäure in einer Proteinsequenz wurde in der dafür kodierenden DNA-Sequenz gezielt eine Punktmutation eingeführt. Für die Mutagenese wurde ein Oligonukleotid mit der ausgetauschten Base und ein dazu komplementäres Oligonukleotid sowie zwei außen liegende Oligonukleotide („upstream“ und „downstream“ von der Mutation) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach einem ähnlichen Prinzip wie bereits für die „overlap“-PCR beschrieben. Aus den zwei separaten PCR-Reaktionen (mit je einem mutierten Oligonukleotid und einem der außen liegenden Oligonukleotide) wurden die aufgereinigten PCR-Produkte in einer dritten PCR mittels komplementärer Basenpaarung wieder verknüpft. Die freien 3'-Enden dienten als Primer für die Polymerase. Mit den äußeren Oligonukleotiden erfolgte die Amplifikation des DNA-Bereiches mit der Punktmutation.

#### 6.3.3.9.5 Kolonie-PCR für *E. coli*-Transformanten

Zur Überprüfung positiver *E. coli*-Transformanten wurden einzelne Kolonien mit einem sterilen Zahnstocher direkt von der Agarplatte in den fertigen PCR-Reaktionsansatz überführt. Die Oligonukleotide wurden mit Hilfe des Programms pDraw so gewählt, dass die PCR-Reaktion vom Vektor ausgehend über das Insert hinweg stattfand. Wenn dies nicht möglich war, wurden ein Oligonukleotid auf dem Vektor und der zweite auf dem Insert (oder im Ausnahmefall beide auf dem Insert liegend) gewählt. Das PCR-Programm richtete sich nach

der Schmelztemperatur der Oligonukleotide und der Länge des PCR-Produktes. Für die Kolonie-PCR wurden 25 Zyklen durchgeführt.

### **6.3.3.9.6 Genomische PCR für *C. reinhardtii*-Transformanten**

Für die Untersuchung von *C. reinhardtii*-Transformanten auf die erfolgreiche Integration der DNA in das Genom, wurden jeweils 5µl des *C. reinhardtii*-Lysates (Herstellung siehe 6.3.2.3) zu 45µl des Mastermixes für die PCR-Reaktion gegeben. Aufgrund des hohen GC-Gehalt des *C. reinhardtii*-Genom und der entsprechenden Codonoptimierung der DNA-Sequenzen wurde die Reaktion in Anwesenheit von 1M Betain durchgeführt (39), was zu einer Erniedrigung der Schmelztemperatur der DNA führte. Für PCR-Amplifikationen, die mit der Taq-Polymerase zu keinem Produkt führten, wurde der HiFi-Polymerase-Mix (GC-Rich PCR System, Fa. Roche) verwendet. Die Oligonukleotide wurden entsprechend der zu untersuchenden Sequenz mit Hilfe des Programms pDraw ausgewählt. Die PCR-Reaktion wurde für 35 Zyklen durchgeführt.

### **6.3.3.10 DNA-Sequenzierung**

Die Sequenzierungsansätze wurden zu MWG Biotech (München) oder GENEART (Regensburg) geschickt.

### **6.3.3.11 Analyse von DNA Sequenzen**

DNA-Sequenzen wurden mit dem Programm DNAMAN überprüft. Die Erstellung von Plasmidkarten, virtuellen Restriktionsverdauen und Primeranalysen erfolgte mit pDraw32.

### **6.3.3.12 Southern Blot-Analyse**

Der spezifische Nachweis der gesuchten DNA-Fragmente erfolgte über die Hybridisierung mit Digoxigenin (DIG)-markierten Sonden. Die Durchführung erfolgte nach dem „DIG Application Manual for Filter Hybridization“ (132).

Die nach 6.3.3.1 verdauten Nukleinsäuren (jeweils 10µg genom. DNA) wurden elektrophoretisch bei 40V für ca. 3-4h in einem 0,7%igem Agarosegel (ohne EtBr) entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Der Transfer der denaturierten, anschließend neutralisierten und in 20xSSC äquilibrierten Nukleinsäuren auf Hybond-N<sup>+</sup> Nylonmembran (Fa. Amersham Biosciences) erfolgte im Kapillarblot-Verfahren mit 20xSSC über Nacht. Nach dem Transfer wurden die Nukleinsäuren durch UV-Licht (254nm) kovalent mit der Membran verknüpft ("crosslink"). Anschließend wurde die Membran nach der Anleitung des DIG Easy Hyb Kits vorbehandelt, nach der Zugabe der denaturierten Sonde für 16-18h bei

45°C hybridisiert und nach Anleitung des DIG Wash and Blocking Sets blockiert. Jeweils 3U Anti-Digoxigenin-AP-Antikörper wurden der Membran nach der Anleitung des Herstellers zugegeben. Die Detektion erfolgte mittels einer chemischen Farbreaktion, bei der die Substrate NBT/BCIP von der an den Antikörper gebundenen Alkalischen Phosphatase (AP) zu einem blauen Farbstoff umgesetzt wurden.

### **6.3.3.12.1 Herstellung der DIG-markierten Sonde**

Die Sonde wurde mit dem DIG High Prime Kit nach Angaben des Herstellers mit Digoxigenin markiert (132). Dafür wurde ein zur analysierenden DNA homologes PCR-Produkt in Anwesenheit von 100µM dATP, 100µM dCTP, 100µM dGTP, 65µM dTTP sowie 35µM DIG-dUTP mit Klenow-Enzym und einer Mischung aller möglichen Hexanukleotide ÜN bei 37°C inkubiert. Es entstand ein Gemisch verschieden langer DNA-Fragmente, welche nach Hitzeinaktivierung des Enzyms für 10min bei 65°C und Denaturierung für 5min bei 95°C als einzelsträngige DIG-markierte DNA zur Hybridisierung eingesetzt werden konnte.

### **6.3.4 Klonierungsschema der verwendeten Plasmide**

Das Klonierungsschema in Abb. 6.3-d gibt einen allgemeinen Überblick über die verschiedenen Reaktionswege vom Ausgangs- zum Zielplasmid. Im folgenden Abschnitt werden die einzelnen Klonierungen mit ihren charakteristischen Merkmalen kurz beschrieben. Alle enzymatischen DNA-Produkte (nach Restriktionsverdau, CIPen, PCR-, PNK- oder Klenow-Reaktion) wurden vor der weiteren Verwendung mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt (nach 6.3.2.4) und anschließend aus dem Gel aufgereinigt (nach 6.3.2.5). DNA-Produkte einer Größe <100bp wurden ohne vorherige Gelelektrophorese direkt mittels DNA-bindender Säulchen aufgereinigt. Alle Inserts, die mit einer PCR-Reaktion (Taq, Vent- oder HiFi-Polymerase) oder durch Hybridisierung von Oligonukleotiden neu synthetisiert wurden, wurden zur Absicherung im Zielplasmid sequenziert.

Allgemeines Klonierungsschema

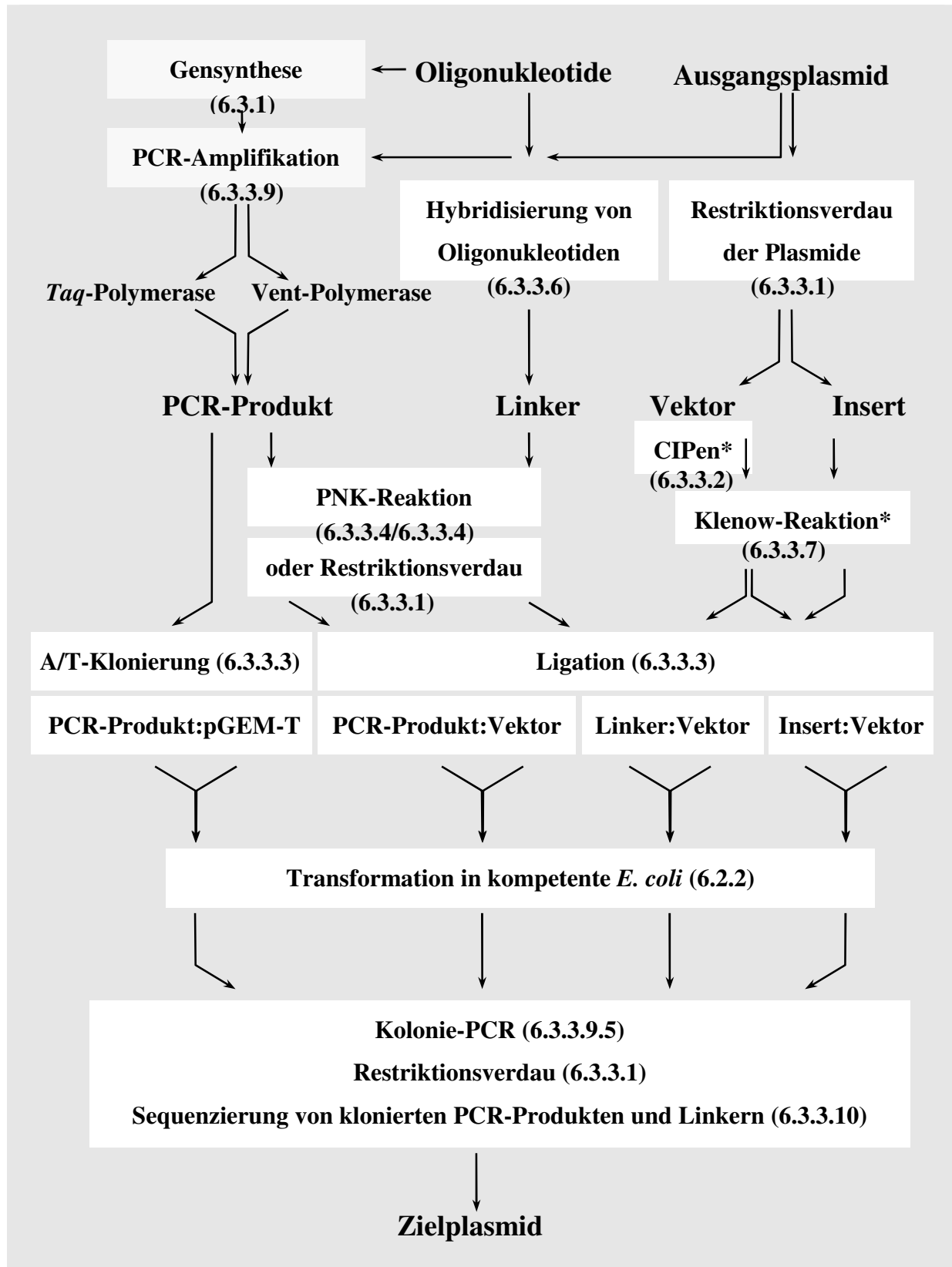


Abb. 6.3-d. Allgemeines Klonierungsschema. \*Die Dephosphorylierung (CIPen) und die Klenow-Reaktion wurden nach Bedarf durchgeführt.

### 6.3.4.1 Expressionsvektoren in *E. coli*

Ausgangsplasmid: ⇒Vektor-Anteil	Ausgangsplasmid: ⇒Insert-Anteil	Zielpasmid: Vektor + Insert
pET16b/ <i>NcoI/XhoI</i> /cip	pXX81/ <i>NcoI/XhoI</i>	pMM83⇒ pET-Cre
pUC18/ <i>SmaI</i> /cip	pSP109⇒PCR1:Bre3/Bre2 pXX81⇒PCR2:Bre1/Cre2 „overlap“-PCR3:Bre3/Cre2, PNK	pMM120
pET16b/ <i>NcoI/XhoI</i> /cip	pMM120/ <i>NcoI/XhoI</i>	pMM121⇒ pET-BleCre
pKS/ <i>SmaI</i> /cip	pSP109⇒PCR:Bre3/Bre4, PNK	pMM143
pKS/ <i>SmaI</i> /cip	pXX81⇒PCR:Bre5/Cre2	pMM147
pET16b/ <i>NcoI/XhoI</i> /cip	pMM143/ <i>NcoI/MluI</i> pMM147/ <i>MluI/XhoI</i>	pMM148⇒ pET-BleLCre
pMM143/ <i>XhoI/MluI</i>	pMM147/ <i>XhoI/MluI</i>	pMM164
pGEM-T	pKS-cGFP⇒PCR: GFPnls; GFPlink	pMM168
pMM164/ <i>NcoI/MluI</i>	pMM168/ <i>NcoI/MluI</i>	pMM172
pET16b/ <i>NcoI/XhoI</i> /cip	pMM172/ <i>NcoI/XhoI</i>	pMM180⇒ pET-cGFPLCre
pXX137/ <i>EcoRI/HindIII</i> /cip	pXX180⇒PCR: nlsEcoRIfw, hisHindIIIrev <i>EcoRI/HindIII</i> -Verdau	pMM256⇒ pcGFPLCre

### 6.3.4.2 *lox*-Plasmide für Rekombinationsassay

Ausgangsplasmid: ⇒ Vektor-Anteil	Ausgangsplasmid: ⇒ Insert-Anteil	Zielpiasmid: Vektor + Insert
pUC18/ <i>SacI</i> / <i>KpnI</i> /cip	pXX107( <i>loxP</i> )/ <i>SacI</i> / <i>KpnI</i>	pMM161
pUC18/ <i>SacI</i> / <i>KpnI</i> /cip	pXX110( <i>loxAC</i> )/ <i>SacI</i> / <i>KpnI</i>	pMM162
pUC18/ <i>SacI</i> / <i>KpnI</i> /cip	pXX106 ( <i>loxGA</i> )/ <i>SacI</i> / <i>KpnI</i>	pMM163
pXX107/ <i>XhoI</i> / <i>Bam</i> HI	pSI105⇒PCR: aphfw, aphrev <i>XhoI</i> / <i>Bam</i> HI-Verdau	pMM169
pKS/ <i>XhoI</i> / <i>Bam</i> HI/cip	pMM169/ <i>KpnI</i> / <i>EcoRI</i>	pMM191
pMM191/ <i>EcoRI</i> /cip	Hybridisierung der ON: <i>lox</i> 35, <i>lox</i> 53⇒ <i>loxP</i> -“linker“ flankiert von <i>EcoRI</i>	pMM198
pMM191/ <i>EcoRI</i> /cip	Hybridisierung der ON: <i>loxGA</i> 53, <i>loxCT</i> 35⇒ <i>loxGA</i> -“linker“ flankiert von <i>EcoRI</i>	pMM199
pMM191/ <i>EcoRI</i> /cip	Hybridisierung der ON: <i>loxAC</i> 53, <i>loxTG</i> 35⇒ <i>loxAC</i> -“linker“ flankiert von <i>EcoRI</i>	pMM204
pMM198/ <i>SacI</i> / <i>XbaI</i> /cip	pMM161/ <i>SacI</i> / <i>XbaI</i>	<b>pMM202</b> ⇒ <b>pCR-2loxP-Aph</b>
pMM199/ <i>SacI</i> / <i>XbaI</i> /cip	pMM163/ <i>SacI</i> / <i>XbaI</i>	<b>pMM203</b> ⇒ <b>pCR-2loxGA-Aph</b>
pMM204/ <i>SacI</i> / <i>XbaI</i> /cip	pMM162/ <i>SacI</i> / <i>XbaI</i>	<b>pMM206</b> ⇒ <b>pCR-2loxAC-Aph</b>
pMM202/ <i>SmaI</i> /religiert		<b>pMM354</b>
pMM203/ <i>SmaI</i> /religiert		<b>pMM355</b>
pMM206/ <i>SmaI</i> /religiert		<b>pMM356</b>

### 6.3.4.3 Expressionsvektoren für *C. reinhardtii* mit ARG7.8 als Selektionsmarker

Ausgangsplasmid: ⇒Vektor-Anteil	Ausgangsplasmid: ⇒Insert-Anteil	Zielpiasmid: Vektor + Insert
pKS/ <i>Sma</i> I/cip	pXX81⇒PCR: CreXhofw, CreBamrev, PNK	pMM166
pSI105/ <i>Xho</i> I/ <i>Bam</i> HI	pMM166/ <i>Xho</i> I/ <i>Bam</i> HI	pMM201
pMM201/ <i>Bam</i> HI/cip	pMM166/ <i>Bam</i> HI	<b>pMM207</b> ⇒pCR-Cre
pKS/ <i>Sma</i> I/cip	Gensynthese für <i>c cre1</i> -Teil⇒PCR: cr1fw1, Chlcre1rev, PNK	pMM286
pKS/ <i>Sma</i> I/cip	Gensynthese für <i>c cre2</i> -Teil⇒PCR: cr2fw1, Chlcre2rev, PNK	pKS- <i>c cre2</i> ** Teil mit 2 Punktmutationen, Entfernung durch „overlap“-PCR
pKS/ <i>Sma</i> I/cip	pKS- <i>c cre2</i> ** ⇒PCR1: cr2fw1, cr2rev9 pKS- <i>c cre2</i> **⇒PCR2: cr2fw10, cr2rev15 “overlap”-PCR3: cr2fw1, cr2rev15, PNK	pMM299
pMM299/ <i>Sma</i> I/cip	pXX237⇒PCR: rbcS2_I3fw, rbcS2_I3rev2, PNK	pMM309
pKS/ <i>Sma</i> I/cip	pMM289⇒PCR1: cr1fw1, chlcre1rev1 pXX237⇒PCR2: rbcS2_I2fw, rbcS2_I2rev “overlap”-PCR3: cr1fw1, rbcS2_I2rev, PNK	pMM304
pGEM-T	pMM304⇒PCR1: cr1fw1, rbcS_Int2rev pMM309⇒PCR2: cr2fw1, chlcre2rev „overlap“-PCR3: cr1fw1, chlcr2rev	pMM315
pSI105/ <i>Xho</i> I/ <i>Bam</i> HI/cip	pMM315/ <i>Xho</i> I/ <i>Bam</i> HI	<b>pMM317</b> ⇒pCR-cCreIn
pUC18/ <i>Sal</i> I/cip	pMM315/ <i>Sal</i> I	pMM370
pMM370/ <i>Nae</i> I/ <i>Spe</i> I	pMM315⇒PCR1: cr2fw13, creMutrev	pMM372*

## METHODEN

Ausgangsplasmid: ⇒Vektor-Anteil	Ausgangsplasmid: ⇒Insert-Anteil	Zielpiasmid: Vektor + Insert
pMM317/ <i>EcoRI/BamHI</i> / cip	pMM315⇒PCR2: creMutfw/reverse “overlap”-PCR3 :  crfw13/reverse, <i>NaeI/SpeI</i> *-Verdau pMM372*/ <i>EcoRI/BamHI</i>	pMM408 ⇒pCR-cCreIn*
pGEM-T	pMM286⇒PCR1: cr1fw1, cdn.cre1rev pMM299⇒PCR1: cdn.cre2fw, chlcre2rev “overlap”-PCR3: cr1fw1, chlcre2rev	pMM409
pMM317/ <i>XhoI/BamHI</i>	pMM409/ <i>XhoI/BamHI</i>	pMM410 ⇒pCR-cCre
pMM409/ <i>SmaI/BamHI</i> / cip	pMM372*⇒PCR: cre2/Smafww, chlcre2rev <i>SmaI/BamHI</i> -Verdau	pMM411*
pSI105/ <i>XhoI/BamHI</i> /cip	pMM411*/ <i>XhoI/BamHI</i>	pMM413* ⇒pCR-cCre*

\*Einführung einer Punktmutation

### 6.3.4.4 Expressionsvektoren für *C. reinhardtii* mit *ble* als Selektionsmarker

Ausgangsplasmid: ⇒Vektor-Anteil	Ausgangsplasmid: ⇒Insert-Anteil	Zielpiasmid: Vektor + Insert
pXX37/ <i>SmaI/BamHI</i> pMM136/ <i>BamHI</i> /cip	pMM120/ <i>SmaI/BamHI</i> pMM120/ <i>BamHI</i>	pMM136 pMM146 ⇒pCR-BleCre
pXX37/ <i>SmaI/BamHI</i> pMM149/ <i>BamHI</i> /cip	pMM148/ <i>SmaI/BamHI</i> pMM148/ <i>BamHI</i>	pMM149 pMM150 ⇒pCR-BleLCre



## METHODEN

Ausgangsplasmid: ⇒Vektor-Anteil	Ausgangsplasmid: ⇒Insert-Anteil	Zielpiasmid: Vektor + Insert
pMM146/ <i>HindIII/EagI</i>	pXX37/ <i>HindIII/EagI</i>	<b>pMM366</b> ⇒ <b>pCR-BleInCre</b>
pMM150/ <i>HindIII/EagI</i>	pXX37/ <i>HindIII/EagI</i>	<b>pMM367</b> ⇒ <b>pCR-BleInLCre</b>
pMM315/ <i>XhoI/SalI/cip</i>	pMM146⇒PCR1: ble(Xho)fw, blecdncrerev pMM315⇒PCR2: cdncrerev, cr1rev10 “overlap”-PCR3: ble(Xho)fw, cr1rev10 <i>XhoI/SalI</i> -Verdau	pMM373 (P.-Mut. Base*60 auf <i>ccre</i> -Teil GAC→GAT, Aspartat bleibt)
pMM373/ <i>SalI/cip</i> pXX37/ <i>XhoI/BamHI</i>	pMM315/ <i>SalI</i> pMM377/ <i>XhoI/BamHI</i>	pMM377(B*60) <b>pMM384</b> (B*60) ⇒ <b>pCR-BlecCreIn</b>
pMM315/ <i>XhoI/SalI/cip</i>	pMM150⇒PCR1: ble(Xho)fw, linkcdncrerev pMM315⇒PCR2: cdncrerev, cr1rev10 “overlap”-PCR3: ble(Xho)fw, cr1rev10 <i>XhoI/SalI</i> -Verdau	pMM375
pMM375/ <i>SalI/cip</i> pXX37/ <i>XhoI/BamHI</i>	pMM315/ <i>SalI</i> pMM378/ <i>XhoI/BamHI</i>	pMM378 <b>pMM385</b> ⇒ <b>pCR-BleLcCreIn</b>
pXX37/ <i>FseI/BamHI</i>	pMM377(B*60)/ <i>FseI/BamHI</i>	<b>pMM386</b> (B*60) ⇒ <b>pCR-BleIncCreIn</b>
pXX37/ <i>FseI/BamHI</i>	pMM378/ <i>FseI/BamHI</i>	<b>pMM387</b> ⇒ <b>pCR-BleInLcCreIn</b>
pMM373(B*60)/ <i>SalI/cip</i> pXX37/ <i>XhoI/BamHI</i>	pMM372*/ <i>SalI</i> pMM379 (B*60)/ <i>XhoI/BamHI</i>	pMM379 (B*60) <b>pMM389</b> (B*60) ⇒ <b>pCR-BlecCreIn*</b>

## METHODEN

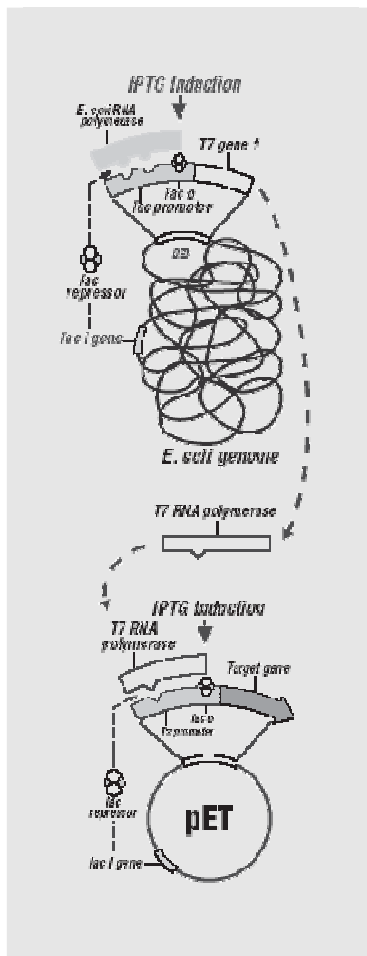
Ausgangsplasmid: ⇒Vektor-Anteil	Ausgangsplasmid: ⇒Insert-Anteil	Zielpasmid: Vektor + Insert
pMM375/ <i>Sall</i> /cip pXX37/ <i>XhoI</i> / <i>Bam</i> HI	pMM372/ <i>Sall</i> pMM380 / <i>XhoI</i> / <i>Bam</i> HI	pMM380 <b>pMM390</b> ⇒pCR-BlelcCreIn*
pXX37/ <i>FseI</i> / <i>Bam</i> HI	pMM379 (B*60)/ <i>FseI</i> / <i>Bam</i> HI	<b>pMM391(B*60)</b> ⇒pCR-BleIncCreIn*
pXX37/ <i>FseI</i> / <i>Bam</i> HI	pMM380/ <i>FseI</i> / <i>Bam</i> HI	<b>pMM392*</b> ⇒pCR-BleInLcCreIn*

### 6.3.4.5 „Cre-Selbsteliminierungs“-Vektoren für *C. reinhardtii*

Ausgangsplasmid: ⇒Vektor-Anteil	Ausgangsplasmid: ⇒Insert-Anteil	Zielpasmid: Vektor + Insert
pMM161/ <i>NcoI</i> / <i>XhoI</i> /cip pMM198/ <i>SacI</i> / <i>XbaI</i> /cip	pMM317/ <i>NcoI</i> / <i>XhoI</i> pMM414/ <i>ScaI</i> -linearisiert Verdau	<i>SacI</i> / <i>XbaI</i> - <b>pMM416</b> ⇒pCR-cCrexInloxP-Aph
pMM161/ <i>NcoI</i> / <i>XhoI</i> /cip	pMM410/ <i>NcoI</i> / <i>XhoI</i>	<i>ccre</i> hinter <i>loxP</i> ließ sich in <i>E. coli</i> nicht klonieren
pMM161/ <i>NcoI</i> / <i>XhoI</i> /cip pMM198/ <i>SacI</i> / <i>XbaI</i> /cip	pMM413/ <i>NcoI</i> / <i>XhoI</i> pMM415/ <i>ScaI</i> -linearisiert <i>SacI</i> / <i>XbaI</i> -Verdau	pMM415 <b>pMM417*</b> ⇒pCR-cCre*loxP-Aph
pMM163/ <i>NcoI</i> / <i>XhoI</i> /cip pMM199/ <i>SacI</i> / <i>XbaI</i> /cip	pMM317/ <i>NcoI</i> / <i>XhoI</i> pMM438/ <i>ScaI</i> -linearisiert Verdau	<i>SacI</i> / <i>XbaI</i> - <b>pMM438</b> <b>pMM439</b> ⇒pCR-cCrexInloxGA-Aph
pMM162/ <i>NcoI</i> / <i>XhoI</i> /cip pMM204/ <i>SacI</i> / <i>XbaI</i> /cip	pMM317/ <i>NcoI</i> / <i>XhoI</i> pMM437/ <i>ScaI</i> -linearisiert Verdau	<i>SacI</i> / <i>XbaI</i> - <b>pMM437</b> <b>pMM440⇒</b> <b>pCR-cCrexInloxAC-Aph</b>

## 6.4 Proteinbiochemische Methoden

### 6.4.1 Heterologe Genexpression in *E. coli*



Zur Expression von rekombinanten Proteinen in *E. coli* wurde das pET-System von Novagen verwendet (114, 161). Das zu exprimierende Gen steht unter der Kontrolle des spezifischen T7lac-Promotors. Die Transkription erfolgt durch die virale T7-RNA-Polymerase, welche genomisch integriert im Expressionsstamm ER2566 vorliegt (siehe Abb. 6.4-a). Die Kontrolle der Expression des gewünschten Gens sowie der T7-RNA-Polymerase erfolgt durch den *lac*-Operator. Das zugegebene IPTG (ein Galaktosidderivat) bindet an das Lac-Repressorprotein. Dadurch wird der *lac*-Operator nicht mehr blockiert. Die Transkription durch die *E. coli* eigene RNA-Polymerase führt zur Expression der T7-RNA Polymerase. Diese erkennt den T7lac-Promotor und die Expression des Zielgens erfolgt. Zusätzlich enthält das Zielgen am 3'-Ende die Sequenz für einen Hexahistidin-Tag (His<sub>6</sub>-Tag) zur späteren Aufreinigung des Proteins mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie.

Abb. 6.4-a pET-System entnommen aus Novagen 10<sup>th</sup> edition (S.13).

Alternativ zum pET-System wurde ein modifizierter pMAL-p2X Vektor (Fa. NEB) für die heterologe Expression in *E. coli* verwendet. Dieser Vektor (pXX137 von Dr. M. Fuhrmann) enthielt statt des Gens für das Maltosebindeproteins (*malE*) die kodierende Sequenz für einen His<sub>12</sub>-Tag, welcher ebenfalls die Aufreinigung mit Ni-NTA-Affinitätschromatographie ermöglichte. Die Expression des Zielgens erfolgt unter Kontrolle des P<sub>tac</sub>-Promotors, der in Abwesenheit von IPTG durch das Lac-Repressorprotein blockiert wird, nach Zugabe von IPTG beginnt ebenfalls die Transkription des Gens durch die *E. coli* RNA-Polymerase. Die Expression wurde in *E. coli* DH5α durchgeführt.

#### 6.4.1.1 Kultivierung und Induktion

Die Kultivierung und die Induktion wurden nach dem pET-System Manual durchgeführt (114). Von der Agarplatte wurde eine Kolonie mit einem sterilen Zahnstocher in 20ml

LB<sub>Amp100</sub> überführt und bei 200rpm und 37°C bis zu einer OD<sub>578</sub>= 0,6-1 (entspricht der exponentiellen Wachstumsphase) inkubiert. Aus der Vorkultur wurden 2ml bei 12800rpm 2min abzentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 1ml frischem Medium resuspendiert und 100ml Hauptkultur angeimpft. Die Inkubation erfolgte bei 200rpm, 37°C bis zu einer OD<sub>578</sub>~0,5. Dann wurde der Schüttelinkubator auf 18°C gestellt, um eine möglichst langsame Expression zu gewährleisten. Nachdem die Kultur auf 18°C heruntergekühlt war, (OD<sub>578</sub>~0,7) wurde die Expression mit 0,3mM IPTG induziert, die Inkubation erfolgte ÜN.

### 6.4.1.2 Ernte und Lyse der Zellen

Für die Ernte wurden die Zellen nach der Expression für 5min auf Eiswasser gekühlt, dann für 20min bei 4000rpm abzentrifugiert (Beckmann-Zentrifuge) und der Überstand verworfen. Für die Lyse der Zellen wurden die Pellets in flüssigem Stickstoff schockgefroren, auf Eiswasser aufgetaut, in 1/25V 1xBindepuffer (4ml) resuspendiert und es wurde Lysozym (ad 100µg/ml) sowie TritonX-100 (ad 0,1%) zugegeben. Nach 30min auf Eis nahm die Viskosität des Lysats infolge der Zelllyse und des DNA-Austritts zu. Zum Denaturieren der DNA wurde ein DNase-Verdau (ad 5µg/ml) für 15min auf Eis durchgeführt. Wenn die Lösung noch zu viskos war, wurde zusätzlich eine Ultraschallbehandlung mit dem „Sonifier Cell Disrupter“ bei Stufe 2-3, dreimal 15s mit jeweils 1min Pause im Eiswasserbad durchgeführt, um die bakterielle DNA möglichst vollständig zu scheren. Das flüssige Lysat wurde dann für 20min bei 4°C in SS34-Röhrchen bzw. im JA25.50-Rotor bei 12000rpm (Sorvall-Zentrifuge) pelletiert, wobei sich im Überstand der lösliche Teil der Proteine und im Pellet der unlösliche Teil, die sogenannten „inclusion bodies“, befanden. Der Überstand wurde bis zur Aufreinigung bei 4°C aufbewahrt. Das Pellet wurde in 4ml 1xBindepuffer resuspendiert und bei -20°C gelagert.

### 6.4.1.3 Proteinaufreinigung

Die Aufreinigung des Proteins erfolgte mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie (125). Das an Agarose gekoppelte Ni-NTA kann 5-10mg His<sub>6</sub>-markierte Proteine/ml Säulenvolumen binden. Durch anschließendes Waschen mit einem Puffer mit niedriger Imidazolkonzentration (20mM) werden unspezifisch gebundene Proteine entfernt. Die Elution der His<sub>6</sub>-markierten Proteine erfolgt bei hohen Imidazolkonzentrationen (250mM), wobei das Protein im Nickel-Protein-Chelatkomplex durch das Imidazol substituiert wird. Für eine möglichst hohe Proteinausbeute wurde die Aufreinigung im „Batch“-Verfahren bei 4°C durchgeführt. Dafür wurde der lösliche Proteinanteil mit dem in 1xBindepuffer äquilibrierten Ni-NTA (1ml Bettvolumen) 1h bei 4°C und 100rpm gerührt. Das Ni-NTA-Lysat wurde in ein vorbereitetes Säulchen gegeben, der Durchlauf gesammelt, das Ni-NTA-Lysat mit 16ml 1xWaschpuffer

von unspezifisch gebundenen Proteinen gereinigt und mit 8ml 1xElutionspuffer (a 4x2ml Fraktionen) von der Ni-NTA-Matrix verdrängt. Das vollständige Lösen von Ni-NTA-Komplexen erfolgte mit 1xStrippuffer, welcher 100mM EDTA anstelle von Imidazol enthielt. Die Regeneration der Ni-NTA-Säule erfolgte mit 1xLadepuffer. Der Durchlauf, die Wasch-, Elutions- und Stripfraktionen wurden bis zur weiteren Analyse bei 4°C gelagert. Für die längere Aufbewahrung wurden die Fraktionen in N<sub>2</sub>fl. schockgefroren und bei -80°C gelagert.

### 6.4.1.4 Dialyse

Zur Entfernung des Imidazols und zur Einstellung der Ionenkonzentration wurden die Elutionsfraktionen gegen einen entsprechenden Puffer dialysiert. Dafür wurde die Lösung in vorbereitete Dialyseschläuche pipettiert und gegen 5l des vorgekühlten Dialysepuffers ÜN bei 4°C unter Rühren dialysiert. Das Dialysat wurde bei 12000rpm für 15min und 4°C abzentrifugiert. Für die weitere Lagerung wurde das Protein dann auf 2mM DTT und 40% Glycerin eingestellt und bei -20°C aufbewahrt. Das Pellet wurde in 100µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert und für spätere Analysen bei -20°C gelagert.

### 6.4.1.5 Aufkonzentrierung von Proteinlösung

Das Aufkonzentrieren von Proteinlösungen erfolgte mittels Ultrafiltration im Centricon D10 (Fa. Amicon) bei 4800rpm und 4°C mit ca. 1ml Durchlauf/15min. Das Konzentrat sammelte sich oberhalb des Filters. Im Durchlauf befanden sich Bestandteile mit einem geringeren Molekulargewicht im Vergleich zur Ausschlussgröße der Membran. In einem weiteren Zentrifugationsschritt konnte nach Invertieren des Centricons das Konzentrat in ein Spitzkölbchen überführt werden.

### 6.4.1.6 Markierung mit FITC

Die Fluoreszenzmarkierung von Proteinen erfolgte nach dem Protokoll des FluoReporter® FITC Protein Labeling Kit (108). Fluoresceinisothiocyanat (FITC) reagiert mit den freien Aminosäuregruppen des Proteins und bildet ein FITC-konjugiertes Protein. Das Absorptions- und Fluoreszenzemissionsmaximum des markierten Proteins liegt bei 494nm und 518 nm, die Analyse des FITC-markierten Proteins erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop.

### 6.4.1.7 Elektroporation

Zur Einführung von Protein in *C. reinhardtii*-Kulturen wurde die Elektroporation nach Hayashi verwendet (63). Dafür wurden 10ml einer Kultur ( $\sim 6 \cdot 10^6$  Zellen/ml) für 5min bei 2500rpm abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 10ml

Elektroporationspuffer (EP-Puffer) gewaschen. Nach einem zweiten Zentrifugationsschritt wurde das Pellet im EP-puffer ad  $1 \cdot 10^8$  Zellen/ml resuspendiert. Für die Elektroporation wurden 125  $\mu$ l einer 1:1 Mischung aus Zellen und Protein im EP-Puffer in eine 2mm Elektroporationsküvette (Fa. Biorad) überführt und für 15min bei 15°C im Wasserbad äquilibriert. Die Elektroporation erfolgte in einer Apparatur der Firma Biorad bei 240V, 24 $\Omega$  bis  $\infty$ , 1200 $\mu$ F. Die Zeitkonstante ergab sich aus den gewählten Einstellungen. Anschließend wurde die Küvette für 30min bei 20°C temperiert und alle 5min geschüttelt. Die Zellen wurden in ein ERG überführt und zweimal mit EP-Puffer gewaschen. Die Analyse der elektroporierten Zellen und der Waschfraktionen erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop.

### **6.4.2 Biochemische Standardmethoden**

#### **6.4.2.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Für die Auftrennung komplexer Proteinmischungen anhand ihres Molekulargewichtes wurde die SDS-PAGE verwendet. Die meisten Proteine binden Natriumdodekylsulfat zu negativ geladenen SDS-Protein-Komplexen mit konstantem Ladungs- zu Masseverhältnis (1,4g SDS/ g Protein). Das SDS denaturiert die Proteine und durch Zugabe von  $\beta$ -Mercaptoethanol oder DTT werden Protein-Protein-Wechselwirkungen durch die Reduktion von Disulfidbrücken unterbunden.

Für die Probenvorbereitung wurden die Proben für 5min bei 95°C in 1xSDS-Probenpuffer erhitzt und 2min bei 128000rpm abzentrifugiert. Ein Aliquot des Überstandes wurde auf ein vorbereitetes SDS-Minigel geladen. Für Proteine mit einem Molekulargewicht von 30 bis 120kDa wurden 10%ige Polyacrylamidgele verwendet. Die Auftrennung der Proteine erfolgte elektrophoretisch bei 25mA und maximaler Voltzahl im Tris-Glycin-HCl-Puffersystem nach Laemmli (87).

#### **6.4.2.2 Coomassiefärbung von SDS-Gelen**

Die Färbung von SDS-Gelen erfolgte mit Coomassie-Färbelösung für ca. 15-30min bei RT unter Schütteln. Der überschüssige Farbstoff wurde durch Erhitzen des Gels in Wasser entfernt. Dafür wurde das SDS-Gel für 5min bei 600W in der Mikrowelle behandelt. Der Vorgang wurde solange mit frischem Wasser wiederholt, bis die Proteinbanden gut sichtbar waren. Die Gele wurden anschließend im Vakuum-Geltrockner auf Whatmanpapier getrocknet.

### 6.4.2.3 Proteinmengenbestimmung nach Bradford

Bei der Bindung von Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine verschiebt sich das Absorptionsmaximum der Farbe von 465nm (ungebunden) zu 595nm (an das Protein gebunden). Zur Bestimmung der Proteinmenge in der Lösung wurde die Zunahme der Absorption bei 595nm mit dem Spektralphotometer gemessen. Als Referenz wurde mit BSA (2mg/ml gelöst in 0,9% NaCl) eine Eichgerade im Bereich von 0-10µg/ml erstellt. Zu den entsprechenden Volumina der Eichlösungen wurde je 1ml Bradford-Reagenz pipettiert, ebenso wurde mit der zu quantifizierenden Proteinslösung verfahren. Nach 15min bei RT erfolgte die spektralphotometrische Messung bei 595nm (Standards und Proben). Die Auswertung erfolgte automatisch durch die Software des Spektralphotometers.

### 6.4.3 Immunologische Methoden

#### 6.4.3.1 Gewinnung von polyklonalen Antisera

Die Herstellung der polyklonalen Antisera erfolgte im Kaninchen durch die Firma Pineda-Antikörper-Service in Berlin.

##### 6.4.3.1.1 Herstellung des Antigens

Die Herstellung des Antigens erfolgte mit Hilfe der heterologen Expression in *E. coli*. Das mit einem Hexahistidin-Tag versehene Protein wurde mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt, dialysiert und im Centricon aufkonzentriert. Die Proteinmengenbestimmung erfolgte nach Bradford. Es wurden ca. 200-500µg Antigen für die Immunisierung zur Firma Pineda-Antikörper-Service nach Berlin geschickt.

##### 6.4.3.1.2 Überprüfung der Präimmunseren und Antikörpergewinnung

Um Kreuzreaktionen mit *C. reinhardtii* eigenen Proteinen zu vermeiden, wurden die Präimmunseren verschiedener Tiere vor Beginn der Immunisierung überprüft. Dafür wurde das Antigen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe eines Western Blots auf eine Nitrocellulose-Membran (NC-Membran) übertragen. Die Membran wurde in 7% Magermilchpulver in PBS/Tween blockiert, zerschnitten und mit den verschiedenen Präimmunseren (1:1000) separat ÜN bei RT inkubiert. Nach einem Waschschriff mit PBS/Tween, der Inkubation mit dem Anti-Kaninchen-IgG-Alkalische Phosphatase-Konjugat und weiteren Waschschriffen (PBS/Tween und PBS), erfolgte die Detektion mit NBT und BCIP. Das Tier mit dem geringsten Hintergrund im gesuchten Molekulargewichtsbereich wurde für die Antikörpergewinnung ausgewählt. Die Immunisierung erfolgte durch die Firma

Pineda-Antikörper-Service über drei Monate hinweg, das Antigen wurde dem Kaninchen subcutan verabreicht. Die Antiseren wurden nach dem 61. Tag, dem 90. Tag und dem 120. Tag mittels Western Blot-Analyse auf das spezifische Antigen überprüft. Nach erfolgreicher Immunisierung wurde den Tieren 50ml Blut abgenommen.

### **6.4.3.1.3 Aufreinigung der Antiseren**

Um unspezifische Kreuzreaktionen von den Kaninchen-Antikörpern mit Proteinen von *C. reinhardtii* zu verhindern, wurden die spezifischen Antikörper vor der Verwendung für Western Blot-Analysen mittels Affinitätsreinigung aus den polyklonalen Antiseren aufgereinigt. Dafür wurden ca. 250µg des Antigens (Lyophilisat in 1xBlotpuffer) auf einen NC-Membran-Streifen (mit 1xBlotpuffer befeuchtet) aufgetüpfelt und an der Luft getrocknet. Die Membran wurde in einem 50ml Falcon Tube 1h in 10ml 7%Magermilchpulver in PBS/Tween unter leichtem Schütteln bei RT blockiert. Der Streifen wurde in ein ERG gelegt und 2ml Immunsersums dazu pipettiert. Die Inkubation erfolgte schüttelnd bei 4°C ÜN. Zum Entfernen von Verunreinigungen wurden die Membran in ein neues Falcon Tube überführt und dreimal für 5min mit 5ml 1xPBS/0,1% BSA, dann zweimal 5min mit 5ml 1xPBS/Tween/0,1%BSA und wieder dreimal 5min 5ml 1xPBS/0,1%BSA gewaschen. Die Membran wurde in ein neues ERG überführt. Durch die Zugabe von 750µl 0,2M Glycin/HCl (pH= 2,7) und 1min vorsichtigem Schütteln löste sich der Antikörper von der Membran. Das erste Eluat wurde in neues ERG mit 375µl 1M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> auf Eis zur Neutralisation überführt. Das zweite Eluat entstand durch erneute Zugabe von 750µl 0,2M Glycin/HCl (pH= 2,7) 1min vorsichtigem Schütteln und Überführung des Überstandes in ein neues ERG mit 375µl 1M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> auf Eis. Beide Eluationsfraktionen wurden mit BSA (10mg/ml) ad 1mg/ml eingestellt und bis zum Gebrauch bei 4°C gelagert.

### **6.4.3.2 Western Blotting**

Mit Hilfe von Western Blotting kann aus einer Vielzahl von Proteinen ein bestimmtes Protein durch Immunopräzipitation detektiert werden (126, 170). Dafür wurde zuerst das Proteingemisch mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Das erhaltene Proteinmuster, separiert nach dem Molekulargewicht, wird durch „blotten“ nach der „semidry“-Methode auf eine NC-Membran übertragen. Dafür wurde der Blot auf dem Boden der Apparatur von unten nach oben wie folgt aufgebaut: vier dicke Whatman-Papiere, NC-Membran, SDS-Gel und vier weitere dicke Whatman-Papiere getränkt in 1xBlotpuffer und luftblasenfrei). Die Blotapparatur wurde verschlossen, der Transfer erfolgte bei 12V, 2mA/cm<sup>2</sup> für 1h von der Kathode zur Anode. Anschließend wurde die NC-Membran 1h in 7%Magermilchpulver in



PBS/Tween blockiert und mit dem ersten Antikörper (entsprechender Verdünnung in 7%Magermilchpulver in PBS/Tween) 1h bis ÜN bei RT inkubiert. Der Blot wurde dreimal für 10min mit PBS/Tween unter Schütteln gewaschen, die Inkubation mit dem zweiten Antikörper (Anti-Tier-IgG-AP-Konjugat in 7%Magermilchpulver in PBS/Tween in entsprechender Verdünnung) erfolgte unter Schütteln für 1h bei RT. Das Entfernen des ungebundenen Antikörpers erfolgte wiederum durch Waschen mit PBS/Tween (zweimal für 10min) und 1xPBS (einmal für 10min). Nach Äquilibrieren der Membran in 1xDetektionspuffer, erfolgte die Detektion chromogenisch. Die Farbreaktion wurde mit 60µl BCIP (10mg/ml) und 6µl NBT (62,5mg/ml) in 10ml Detektionspuffer durch die Alkalische Phosphatase des sekundären Antikörpers vermittelt. Das Protein wurde als blaue Bande sichtbar. Die Detektion wurde mit ddH<sub>2</sub>O abgestoppt.

### **6.4.3.3 Färbung von Blot-Membranen mit Ponceau S**

Um den Erfolg des Proteintransfers beim Western Blot zu überprüfen, wurde die NC-Membran mit Ponceau S-Färbelösung reversibel für 1-2min bei RT gefärbt. Der überschüssige Azofarbstoff wurde anschließend mit ddH<sub>2</sub>O wieder von der Membran gewaschen, die Banden des Molekulargewichtsstandards mit einem Kugelschreiber markiert. Bei den folgenden Waschschritten im Western Blot wurden restliche Farbstoffe entfernt, so dass die immunochemische Detektion der Proteine nicht gestört war.

## **6.4.4 Analyse von Reportergenen**

### **6.4.4.1 Lumineszenzmessung**

Die Luciferase benötigt bei direkter Zugabe des Substrates Coelenterazin für seine Aktivität keine weiteren Proteine (93). Bei der Umsetzung des Substrates wird blaues Licht ( $\lambda = 483\text{nm}$ ) emittiert. Die Messung der Luciferaseaktivität wurde mit dem Luminometer (Polarstar optima) in einer Mikrotiterplatte durchgeführt. Es wurden, abhängig von der Zelldichte, 50µl Kultur + 150µl TAP bzw. 100µl + 100µl TAP vermessen. Direkt vor der Messung wurden jeweils 10µl einer 100µM Coelenterazin-Lösung in die Reaktionskammer injiziert (Endkonzentration 5µM). Die gesamte Mikrotiterplatte wurde im Gerät vor Beginn der Messung für 5s geschüttelt. Nach der Zugabe des Substrates wurde die Freisetzung der Photonen 20s lang detektiert und das Ergebnis gemittelt.

## 7 LITERATUR

1. **Abremski, K., and R. Hoess.** 1984. Bacteriophage P1 site-specific recombination. Purification and properties of the Cre recombinase protein. *J Biol Chem* **259**:1509-14.
2. **Abremski, K., R. Hoess, and N. Sternberg.** 1983. Studies on the properties of P1 site-specific recombination: evidence for topologically unlinked products following recombination. *Cell* **32**:1301-11.
3. **Albert, H., E. C. Dale, E. Lee, and D. W. Ow.** 1995. Site-specific integration of DNA into wild-type and mutant lox sites placed in the plant genome. *Plant J* **7**:649-59.
4. **Argos, P., A. Landy, K. Abremski, J. B. Egan, E. Haggard-Ljungquist, R. H. Hoess, M. L. Kahn, B. Kalionis, S. V. Narayana, L. S. Pierson, 3rd, and et al.** 1986. The integrase family of site-specific recombinases: regional similarities and global diversity. *Embo J* **5**:433-40.
5. **Austin, S., M. Ziese, and N. Sternberg.** 1981. A novel role for site-specific recombination in maintenance of bacterial replicons. *Cell* **25**:729-36.
6. **Baubonis, W., and B. Sauer.** 1993. Genomic targeting with purified Cre recombinase. *Nucleic Acids Res* **21**:2025-9.
7. **Berthold, P., R. Schmitt, and W. Mages.** 2002. An engineered *Streptomyces hygrosopicus* aph 7" gene mediates dominant resistance against hygromycin B in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Protist* **153**:401-12.
8. **Bibikova, M., D. Carroll, D. J. Segal, J. K. Trautman, J. Smith, Y. G. Kim, and S. Chandrasegaran.** 2001. Stimulation of homologous recombination through targeted cleavage by chimeric nucleases. *Mol Cell Biol* **21**:289-97.
9. **Bishop, J. O., and P. Smith.** 1989. Mechanism of chromosomal integration of microinjected DNA. *Mol Biol Med* **6**:283-98.
10. **Blowers, A. D., G. S. Ellmore, U. Klein, and L. Bogorad.** 1990. Transcriptional analysis of endogenous and foreign genes in chloroplast transformants of *Chlamydomonas*. *Plant Cell* **2**:1059-70.
11. **Bode, J., T. Schlake, M. Iber, D. Schubeler, J. Seibler, E. Snezhkov, and L. Nikolaev.** 2000. The transgeneticist's toolbox: novel methods for the targeted modification of eukaryotic genomes. *Biol Chem* **381**:801-13.
12. **Bollag, R. J., A. S. Waldman, and R. M. Liskay.** 1989. Homologous recombination in mammalian cells. *Annu Rev Genet* **23**:199-225.
13. **Boynton, J. E., N. W. Gillham, E. H. Harris, J. P. Hosler, A. M. Johnson, A. R. Jones, B. L. Randolph-Anderson, D. Robertson, T. M. Klein, K. B. Shark, and et al.** 1988. Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science* **240**:1534-8.
14. **Calmels, T. P., J. S. Mistry, S. C. Watkins, P. D. Robbins, R. McGuire, and J. S. Lazo.** 1993. Nuclear localization of bacterial *Streptoalloteichus hindustanus* bleomycin resistance protein in mammalian cells. *Mol Pharmacol* **44**:1135-41.
15. **Cedergren, R., M. W. Gray, Y. Abel, and D. Sankoff.** 1988. The evolutionary relationships among known life forms. *J Mol Evol* **28**:98-112.
16. **Cerutti, H., A. M. Johnson, J. E. Boynton, and N. W. Gillham.** 1995. Inhibition of chloroplast DNA recombination and repair by dominant negative mutants of *Escherichia coli* RecA. *Mol Cell Biol* **15**:3003-11.
17. **Cerutti, H., A. M. Johnson, N. W. Gillham, and J. E. Boynton.** 1997. Epigenetic silencing of a foreign gene in nuclear transformants of *Chlamydomonas*. *Plant Cell* **9**:925-45.
18. **Cerutti, H., A. M. Johnson, N. W. Gillham, and J. E. Boynton.** 1997. A eubacterial gene conferring spectinomycin resistance on *Chlamydomonas reinhardtii*: integration into the nuclear genome and gene expression. *Genetics* **145**:97-110.
19. **Cerutti, H., M. Osman, P. Grandoni, and A. T. Jagendorf.** 1992. A homolog of *Escherichia coli* RecA protein in plastids of higher plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:8068-72.
20. **Coppoolse, E. R., M. J. de Vroomen, D. Roelofs, J. Smit, F. van Gennip, B. J. Hersmus, H. J. Nijkamp, and M. J. van Haaren.** 2003. Cre recombinase expression can result in phenotypic aberrations in plants. *Plant Mol Biol* **51**:263-79.
21. **Corneille, S., K. A. Lutz, A. K. Azhagiri, and P. Maliga.** 2003. Identification of functional lox sites in the plastid genome. *Plant J* **35**:753-62.
22. **Craig, N. L.** 1988. The mechanism of conservative site-specific recombination. *Annu Rev Genet* **22**:77-105.
23. **Cuellar, W., A. Gaudin, D. Solorzano, A. Casas, L. Nopo, P. Chudalayandi, G. Medrano, J. Kreuze, and M. Ghislain.** 2006. Self-excision of the antibiotic resistance gene nptII using a heat inducible Cre-loxP system from transgenic potato. *Plant Mol Biol* **62**:71-82.

24. **Dale, E. C., and D. W. Ow.** 1991. Gene transfer with subsequent removal of the selection gene from the host genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:10558-62.
25. **Day, A., and J. D. Rochaix.** 1991. Conservation in structure of TOC1 transposons from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Gene* **104**:235-9.
26. **Day, C. D., E. Lee, J. Kobayashi, L. D. Holappa, H. Albert, and D. W. Ow.** 2000. Transgene integration into the same chromosome location can produce alleles that express at a predictable level, or alleles that are differentially silenced. *Genes Dev* **14**:2869-80.
27. **De Buck, S., M. Van Montagu, and A. Depicker.** 2001. Transgene silencing of invertedly repeated transgenes is released upon deletion of one of the transgenes involved. *Plant Molecular Biology* **46**:433-445.
28. **Debuchy, R., S. Purton, and J. D. Rochaix.** 1989. The argininosuccinate lyase gene of *Chlamydomonas reinhardtii*: an important tool for nuclear transformation and for correlating the genetic and molecular maps of the ARG7 locus. *Embo J* **8**:2803-9.
29. **Diener, D. R., A. M. Curry, K. A. Johnson, B. D. Williams, P. A. Lefebvre, K. L. Kindle, and J. L. Rosenbaum.** 1990. Rescue of a paralyzed-flagella mutant of *Chlamydomonas* by transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:5739-43.
30. **Durrenberger, F., A. J. Thompson, D. L. Herrin, and J. D. Rochaix.** 1996. Double strand break-induced recombination in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts. *Nucleic Acids Res* **24**:3323-31.
31. **Ebnet, E., M. Fischer, W. Deininger, and P. Hegemann.** 1999. Volvoxrhodopsin, a light-regulated sensory photoreceptor of the spheroidal green alga *Volvox carteri*. *Plant Cell* **11**:1473-84.
32. **Eichler-Stahlberg, A.** 2005. Verwendung der einzelligen Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* als Expressionssystem für Synthese und Export rekombinanter Proteine. Dissertation- Universität Regensburg, Naturwissenschaftliche Fakultät III - Biologie und Vorklinische Medizin.
33. **Feng, Y. Q., J. Seibler, R. Alami, A. Eisen, K. A. Westerman, P. Leboulch, S. Fiering, and E. E. Bouhassira.** 1999. Site-specific chromosomal integration in mammalian cells: highly efficient CRE recombinase-mediated cassette exchange. *J Mol Biol* **292**:779-85.
34. **Ferris, P. J.** 1989. Characterization of a *Chlamydomonas* transposon, Gulliver, resembling those in higher plants. *Genetics* **122**:363-77.
35. **Finnegan, E. J., B. H. Taylor, S. Craig, and E. S. Dennis.** 1989. Transposable elements can be used to study cell lineages in transgenic plants. *Plant Cell* **1**:757-64.
36. **Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, and C. C. Mello.** 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**:806-811.
37. **Fischer, N., O. Stampacchia, K. Redding, and J. D. Rochaix.** 1996. Selectable marker recycling in the chloroplast. *Mol Gen Genet* **251**:373-80.
38. **Folger, K. R., E. A. Wong, G. Wahl, and M. R. Capecchi.** 1982. Patterns of integration of DNA microinjected into cultured mammalian cells: evidence for homologous recombination between injected plasmid DNA molecules. *Mol Cell Biol* **2**:1372-87.
39. **Frackman, S., G. Kobs, D. Simpson, and D. Storts.** 1998. Betaine and DMSO: Enhancing Agents for PCR. *Promega Notes* **65**:27.
40. **Franklin, S., B. Ngo, E. Efuet, and S. P. Mayfield.** 2002. Development of a GFP reporter gene for *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *Plant J* **30**:733-44.
41. **Fuhrmann, M., A. Hausherr, L. Ferbitz, T. Schodl, M. Heitzer, and P. Hegemann.** 2004. Monitoring dynamic expression of nuclear genes in *Chlamydomonas reinhardtii* by using a synthetic luciferase reporter gene. *Plant Mol Biol* **55**:869-81.
42. **Fuhrmann, M., W. Oertel, and P. Hegemann.** 1999. A synthetic gene coding for the green fluorescent protein (GFP) is a versatile reporter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J* **19**:353-61.
43. **Fuhrmann, M., A. Stahlberg, E. Govorunova, S. Rank, and P. Hegemann.** 2001. The abundant retinal protein of the *Chlamydomonas* eye is not the photoreceptor for phototaxis and photophobic responses. *J Cell Sci* **114**:3857-63.
44. **Fukushige, S., and B. Sauer.** 1992. Genomic targeting with a positive-selection lox integration vector allows highly reproducible gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:7905-9.
45. **Futcher, A. B.** 1986. Copy number amplification of the 2 micron circle plasmid of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Theor Biol* **119**:197-204.
46. **Gagneten, S., Y. Le, J. Miller, and B. Sauer.** 1997. Brief expression of a GFP cre fusion gene in embryonic stem cells allows rapid retrieval of site-specific genomic deletions. *Nucleic Acids Res* **25**:3326-31.
47. **Garfinkel, D. J., M. F. Mastrangelo, N. J. Sanders, B. K. Shafer, and J. N. Strathern.** 1988. Transposon tagging using Ty elements in yeast. *Genetics* **120**:95-108.
48. **Gheysen, G., and B. Vanholme.** 2007. RNAi from plants to nematodes. *Trends Biotechnol* **25**:89-92.
49. **Ghosh, K., and G. D. Van Duyne.** 2002. Cre-loxP biochemistry. *Methods* **28**:374-83.

50. **Goedecke, W., P. Pfeiffer, and W. Vielmetter.** 1994. Nonhomologous DNA end joining in *Schizosaccharomyces pombe* efficiently eliminates DNA double-strand-breaks from haploid sequences. *Nucleic Acids Res* **22**:2094-101.
51. **Goldschmidt-Clermont, M.** 1991. Transgenic expression of aminoglycoside adenine transferase in the chloroplast: a selectable marker of site-directed transformation of *Chlamydomonas*. *Nucleic Acids Res* **19**:4083-9.
52. **Grevelding, C., D. Becker, R. Kunze, A. von Menges, V. Fantes, J. Schell, and R. Masterson.** 1992. High rates of Ac/Ds germinal transposition in *Arabidopsis* suitable for gene isolation by insertional mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:6085-9.
53. **Grimm, C., and J. Kohli.** 1988. Observations on integrative transformation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet* **215**:87-93.
54. **Grindley, N. D., M. R. Lauth, R. G. Wells, R. J. Wityk, J. J. Salvo, and R. R. Reed.** 1982. Transposon-mediated site-specific recombination: identification of three binding sites for resolvase at the res sites of gamma delta and Tn3. *Cell* **30**:19-27.
55. **Grossman, A. R., E. E. Harris, C. Hauser, P. A. Lefebvre, D. Martinez, D. Rokhsar, J. Shrager, C. D. Silflow, D. Stern, O. Vallon, and Z. Zhang.** 2003. *Chlamydomonas reinhardtii* at the crossroads of genomics. *Eukaryot Cell* **2**:1137-50.
56. **Gumpel, N. J., J. D. Rochaix, and S. Purton.** 1994. Studies on homologous recombination in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Curr Genet* **26**:438-42.
57. **Guo, F., D. N. Gopaul, and G. D. van Duyne.** 1997. Structure of Cre recombinase complexed with DNA in a site-specific recombination synapse. *Nature* **389**:40-6.
58. **Hallmann, A., A. Rappel, and M. Sumper.** 1997. Gene replacement by homologous recombination in the multicellular green alga *Volvox carteri*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:7469-74.
59. **Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**:557-80.
60. **Hanin, M., S. Volrath, A. Bogucki, M. Briker, E. Ward, and J. Paszkowski.** 2001. Gene targeting in *Arabidopsis*. *Plant J* **28**:671-7.
61. **Harris, E. H.** 2001. *Chlamydomonas* as a Model Organism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**:363-406.
62. **Harris, E. H.** 1989. The *Chlamydomonas* Sourcebook. Academic Press, San Diego.
63. **Hayashi, M., M. Hirono, and R. Kamiya.** 2001. Recovery of flagellar dynein function in a *Chlamydomonas* actin/dynein-deficient mutant upon introduction of muscle actin by electroporation. *Cell Motil Cytoskeleton* **49**:146-53.
64. **Hayashi, M., H. A. Yanagisawa, M. Hirono, and R. Kamiya.** 2002. Rescue of a *Chlamydomonas* inner-arm-dynein-deficient mutant by electroporation-mediated delivery of recombinant p28 light chain. *Cell Motil Cytoskeleton* **53**:273-80.
65. **Hoess, R., K. Abremski, and N. Sternberg.** 1984. The nature of the interaction of the P1 recombinase Cre with the recombining site loxP. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **49**:761-8.
66. **Hoess, R. H., A. Wierzbicki, and K. Abremski.** 1986. The role of the loxP spacer region in P1 site-specific recombination. *Nucleic Acids Res* **14**:2287-300.
67. **Hoff, T., K. M. Schnorr, and J. Mundy.** 2001. A recombinase-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *Plant Mol Biol* **45**:41-9.
68. **Hutner, S. H., L. Provasoli, A. Schatz, and C. P. Haskins.** 1950. Some approaches to the study of the role of metals in the metabolism of microorganisms. *S. A. Proc. Americ. Philosophical Soc.* **94**:153-170.
69. **Iglesias, V. A., E. A. Moscone, I. Papp, F. Neuhuber, S. Michalowski, T. Phelan, S. Spiker, M. Matzke, and A. J. Matzke.** 1997. Molecular and cytogenetic analyses of stably and unstably expressed transgene loci in tobacco. *Plant Cell* **9**:1251-64.
70. **Izsvak, Z., E. E. Stuve, D. Fiedler, A. Katzer, P. A. Jeggo, and Z. Ivics.** 2004. Healing the wounds inflicted by sleeping beauty transposition by double-strand break repair in mammalian somatic cells. *Mol Cell* **13**:279-90.
71. **Jasin, M.** 1996. Genetic manipulation of genomes with rare-cutting endonucleases. *Trends Genet* **12**:224-8.
72. **Jeong Br, B. R., D. Wu-Scharf, C. Zhang, and H. Cerutti.** 2002. Suppressors of transcriptional transgenic silencing in *Chlamydomonas* are sensitive to DNA-damaging agents and reactivate transposable elements. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:1076-81.
73. **Jia, H., Y. Pang, X. Chen, and R. Fang.** 2006. Removal of the selectable marker gene from transgenic tobacco plants by expression of Cre recombinase from a tobacco mosaic virus vector through agroinfection. *Transgenic Res* **15**:375-84.
74. **Johnson, R. C., M. B. Bruist, M. B. Glaccum, and M. I. Simon.** 1984. In vitro analysis of Hin-mediated site-specific recombination. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **49**:751-60.

75. **Kalderon, D., W. D. Richardson, A. F. Markham, and A. E. Smith.** 1984. Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen. *Nature* **311**:33-8.
76. **Kempin, S. A., S. J. Liljegren, L. M. Block, S. D. Rounsley, M. F. Yanofsky, and E. Lam.** 1997. Targeted disruption in *Arabidopsis*. *Nature* **389**:802-3.
77. **KFB-Regensburg.** 2005. Gene builder™ Gene synthesis kit - Manual.
78. **Kindle, K. L.** 1990. High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:1228-32.
79. **Kindle, K. L., R. A. Schnell, E. Fernandez, and P. A. Lefebvre.** 1989. Stable nuclear transformation of *Chlamydomonas* using the *Chlamydomonas* gene for nitrate reductase. *J Cell Biol* **109**:2589-601.
80. **Kleckner, N.** 1990. Regulation of transposition in bacteria. *Annu Rev Cell Biol* **6**:297-327.
81. **Koch, B., L. E. Jensen, and O. Nybroe.** 2001. A panel of Tn7-based vectors for insertion of the gfp marker gene or for delivery of cloned DNA into Gram-negative bacteria at a neutral chromosomal site. *J Microbiol Methods* **45**:187-95.
82. **Kolb, A. F., R. Ansell, J. McWhir, and S. G. Siddell.** 1999. Insertion of a foreign gene into the beta-casein locus by Cre-mediated site-specific recombination. *Gene* **227**:21-31.
83. **Kolb, A. F., and S. G. Siddell.** 1996. Genomic targeting with an MBP-Cre fusion protein. *Gene* **183**:53-60.
84. **Kozak, M.** 1989. Circumstances and mechanisms of inhibition of translation by secondary structure in eucaryotic mRNAs. *Mol Cell Biol* **9**:5134-42.
85. **Kwoh, D. Y., and D. Zipser.** 1981. Identification of the gin protein of bacteriophage mu. *Virology* **114**:291-6.
86. **Ladygin, V. G.** 2003. [The transformation of the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation]. *Mikrobiologiya* **72**:658-65.
87. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-5.
88. **Lambertsen, L., C. Sternberg, and S. Molin.** 2004. Mini-Tn7 transposons for site-specific tagging of bacteria with fluorescent proteins. *Environ Microbiol* **6**:726-32.
89. **Lee, G., and I. Saito.** 1998. Role of nucleotide sequences of loxP spacer region in Cre-mediated recombination. *Gene* **216**:55-65.
90. **Lewin, B.** 2004. *Genes* VIII ed. Pearson Education, Inc. Pearson Prentice Hall.
91. **Liu, Q., M. Z. Li, D. Leibham, D. Cortez, and S. J. Elledge.** 1998. The univector plasmid-fusion system, a method for rapid construction of recombinant DNA without restriction enzymes. *Curr Biol* **8**:1300-9.
92. **Loonstra, A., M. Vooijs, H. B. Beverloo, B. A. Allak, E. van Drunen, R. Kanaar, A. Berns, and J. Jonkers.** 2001. Growth inhibition and DNA damage induced by Cre recombinase in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:9209-14.
93. **Lorenz, W. W., R. O. McCann, M. Longiaru, and M. J. Cormier.** 1991. Isolation and expression of a cDNA encoding *Renilla reniformis* luciferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:4438-42.
94. **Lumbreras, V., D. R. Stevens, and S. Purton.** 1998. Efficient foreign gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii* mediated by an endogenous intron *Plant J* **14**:441-447.
95. **Lykke-Andersen, K.** 2006. Regulation of gene expression in mouse embryos and its embryonic cells through RNAi. *Mol Biotechnol* **34**:271-8.
96. **MACHERY-NAGEL.** 2003. PCR clean-up Gel extraction- User manual- NucleoSpin® Extract II.
97. **MACHERY-NAGEL.** 2003. Plasmid DNA Purification- User manual- NucleoSpin® Plasmid.
98. **Mahonen, A. J., K. J. Aireenne, M. M. Lind, H. P. Lesch, and S. Yla-Herttuala.** 2004. Optimized self-excising Cre-expression cassette for mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* **320**:366-71.
99. **Matzke, A. J., and M. A. Matzke.** 1998. Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes. *Curr Opin Plant Biol* **1**:142-8.
100. **Matzke, M. A., and A. J. Matzke.** 1995. Homology-dependent gene silencing in transgenic plants: what does it really tell us? *Trends Genet* **11**:1-3.
101. **Matzke, M. A., M. F. Mette, and A. J. Matzke.** 2000. Transgene silencing by the host genome defense: implications for the evolution of epigenetic control mechanisms in plants and vertebrates. *Plant Mol Biol* **43**:401-15.
102. **Mayfield, S. P., S. E. Franklin, and R. A. Lerner.** 2003. Expression and assembly of a fully active antibody in algae. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:438-42.
103. **Mayfield, S. P., and K. L. Kindle.** 1990. Stable nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by using a *C. reinhardtii* gene as the selectable marker. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:2087-91.
104. **Mayfield, S. P., and J. Schultz.** 2004. Development of a luciferase reporter gene, luxCt, for *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *Plant J* **37**:449-58.

105. **Metzger, D., J. Clifford, H. Chiba, and P. Chambon.** 1995. Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:6991-5.
106. **Miao, Z. H., and E. Lam.** 1995. Targeted disruption of the TGA3 locus in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **7**:359-65.
107. **Mizuuchi, K., R. Weisberg, L. Enquist, M. Mizuuchi, M. Buraczynska, C. Foeller, P. L. Hsu, W. Ross, and A. Landy.** 1981. Structure and function of the phage lambda att site: size, int-binding sites, and location of the crossover point. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **45 Pt 1**:429-37.
108. **MolecularProbes.** 2001. FluoReporter® FITC Labeling Kit-Product Information.
109. **Motto, M., R. Marotta, N. Di Fonzo, C. Soave, and F. Salamini.** 1986. Ds-Induced Alleles at the OPAQUE-2 Locus of Maize. *Genetics* **112**:121-133.
110. **Nakazato, E., H. Fukuzawa, S. Tabata, H. Takahashi, and K. Tanaka.** 2003. Identification and expression analysis of cDNA encoding a chloroplast recombination protein REC1, the chloroplast RecA homologue in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biosci Biotechnol Biochem* **67**:2608-13.
111. **Naya, H., H. Romero, N. Carels, A. Zavala, and H. Musto.** 2001. Translational selection shapes codon usage in the GC-rich genome of *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett* **501**:127-30.
112. **Nelson, J. A., and P. A. Lefebvre.** 1995. Targeted disruption of the NIT8 gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol Cell Biol* **15**:5762-9.
113. **Nelson, J. A., P. B. Saveriede, and P. A. Lefebvre.** 1994. The CRY1 gene in *Chlamydomonas reinhardtii*: structure and use as a dominant selectable marker for nuclear transformation. *Mol Cell Biol* **14**:4011-9.
114. **Novagen.** 1997. pET System Manual, seventh edition ed.
115. **Onouchi, H., K. Yokoi, C. Machida, H. Matsuzaki, Y. Oshima, K. Matsuoka, K. Nakamura, and Y. Machida.** 1991. Operation of an efficient site-specific recombination system of *Zygosaccharomyces rouxii* in tobacco cells. *Nucleic Acids Res* **19**:6373-8.
116. **Oppermann, T., T. H. Hong, and S. J. Surzycki.** 1989. Chloroplast and nuclear genomes of *Chlamydomonas reinhardtii* share homology with *Escherichia coli* genes for DNA replication, repair and transcription. *Curr Genet* **15**:39-46.
117. **Orr-Weaver, T. L., J. W. Szostak, and R. J. Rothstein.** 1981. Yeast transformation: a model system for the study of recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**:6354-8.
118. **Paszkowski, J., and S. A. Whitham.** 2001. Gene silencing and DNA methylation processes. *Curr Opin Plant Biol* **4**:123-9.
119. **Pawlowski, W. P., and D. A. Somers.** 1998. Transgenic DNA integrated into the oat genome is frequently interspersed by host DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:12106-10.
120. **Plessis, A., and B. Dujon.** 1993. Multiple tandem integrations of transforming DNA sequences in yeast chromosomes suggest a mechanism for integrative transformation by homologous recombination. *Gene* **134**:41-50.
121. **Povirk, L. F.** 1996. DNA damage and mutagenesis by radiomimetic DNA-cleaving agents: bleomycin, neocarzinostatin and other enediynes. *Mutat Res* **355**:71-89.
122. **Promega.** 2003. pGEM-T® and pGEM-T® Easy Vector Systems-Technical Manual
123. **Promega.** 2005. Wizard® Genomic DNA Purification Kit - Technical Manual.
124. **Qiagen.** 2000. DNeasy® Plant Mini Kit - For DNA isolation from plant tissue.
125. **Qiagen.** 1997. The QIAexpressionist-A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins, third ed.
126. **Quarrie, S. A., and G. Galfre.** 1985. Use of different hapten-protein conjugates immobilized on nitrocellulose to screen monoclonal antibodies to abscisic acid. *Anal Biochem* **151**:389-99.
127. **Quinn, J. M., J. Kropat, and S. Merchant.** 2003. Copper response element and Crr1-dependent Ni(2+)-responsive promoter for induced, reversible gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot Cell* **2**:995-1002.
128. **Randolph-Anderson, B. L., J. E. Boynton, N. W. Gillham, E. H. Harris, A. M. Johnson, M. P. Dorthu, and R. F. Matagne.** 1993. Further characterization of the respiratory deficient dum-1 mutation of *Chlamydomonas reinhardtii* and its use as a recipient for mitochondrial transformation. *Mol Gen Genet* **236**:235-44.
129. **Reiss, B., M. Klemm, H. Kosak, and J. Schell.** 1996. RecA protein stimulates homologous recombination in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:3094-8.
130. **Riggs, C. D., and G. W. Bates.** 1986. Stable transformation of tobacco by electroporation: evidence for plasmid concatenation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**:5602-6.
131. **Rio, D. C., G. Barnes, F. A. Laski, J. Rine, and G. M. Rubin.** 1988. Evidence for *Drosophila* P element transposase activity in mammalian cells and yeast. *J Mol Biol* **200**:411-5.
132. **Roche.** 2000. DIG Application Manual for Filter Hybridization.
133. **Rubin, G. M., and A. C. Spradling.** 1982. Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science* **218**:348-53.

134. **Sadowski, P. D.** 1993. Site-specific genetic recombination: hops, flips, and flops. *Faseb J* **7**:760-7.
135. **Sakagami, K., Y. Tokinaga, H. Yoshikura, and I. Kobayashi.** 1994. Homology-associated nonhomologous recombination in mammalian gene targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:8527-31.
136. **Sakai, A., Y. Shimizu, and F. Hishinuma.** 1990. Integration of heterologous genes into the chromosome of *Saccharomyces cerevisiae* using a delta sequence of yeast retrotransposon Ty. *Appl Microbiol Biotechnol* **33**:302-6.
137. **Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. *Molecular Cloning: A Laboratorial Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
138. **Sauer, B.** 1987. Functional expression of the cre-lox site-specific recombination system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **7**:2087-96.
139. **Sauer, B.** 1992. Identification of cryptic lox sites in the yeast genome by selection for Cre-mediated chromosome translocations that confer multiple drug resistance. *J Mol Biol* **223**:911-28.
140. **Sauer, B., and N. Henderson.** 1989. Cre-stimulated recombination at loxP-containing DNA sequences placed into the mammalian genome. *Nucleic Acids Res* **17**:147-61.
141. **Schaefer, D. G., and J. P. Zryd.** 1997. Efficient gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant J* **11**:1195-206.
142. **Schmidt, E. E., D. S. Taylor, J. R. Prigge, S. Barnett, and M. R. Capecchi.** 2000. Illegitimate Cre-dependent chromosome rearrangements in transgenic mouse spermatids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:13702-7.
143. **Schnell, R. A., and P. A. Lefebvre.** 1993. Isolation of the *Chlamydomonas* regulatory gene NIT2 by transposon tagging. *Genetics* **134**:737-47.
144. **Schroda, M.** 2006. RNA silencing in *Chlamydomonas*: mechanisms and tools. *Curr Genet* **49**:69-84.
145. **Schroda, M., D. Blocker, and C. F. Beck.** 2000. The HSP70A promoter as a tool for the improved expression of transgenes in *Chlamydomonas*. *Plant J* **21**:121-31.
146. **Semprini, S., T. J. Troup, N. Kotelevtseva, K. King, J. R. Davis, L. J. Mullins, K. E. Chapman, D. R. Dunbar, and J. J. Mullins.** 2007. Cryptic loxP sites in mammalian genomes: genome-wide distribution and relevance for the efficiency of BAC/PAC recombineering techniques. *Nucleic Acids Res.*
147. **Shaikh, A. C., and P. D. Sadowski.** 1997. The Cre recombinase cleaves the lox site in trans. *J Biol Chem* **272**:5695-702.
148. **Shalev, G., Y. Sitrit, N. Avivi-Ragolski, C. Lichtenstein, and A. A. Levy.** 1999. Stimulation of homologous recombination in plants by expression of the bacterial resolvase *ruvC*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:7398-402.
149. **Shalguev, V. I., O. K. Kaboev, I. A. Sizova, P. Hegemann, and V. A. Lantsov.** 2005. [Identification of Rad51 protein from *Chlamydomonas reinhardtii*: recombinational characteristics]. *Mol Biol (Mosk)* **39**:112-9.
150. **Shimshek, D. R., J. Kim, M. R. Hubner, D. J. Spergel, F. Buchholz, E. Casanova, A. F. Stewart, P. H. Seeburg, and R. Sprengel.** 2002. Codon-improved Cre recombinase (iCre) expression in the mouse. *Genesis* **32**:19-26.
151. **Shinohara, A., and T. Ogawa.** 1995. Homologous recombination and the roles of double-strand breaks. *Trends Biochem Sci* **20**:387-91.
152. **Silver, D. P., and D. M. Livingston.** 2001. Self-excising retroviral vectors encoding the Cre recombinase overcome Cre-mediated cellular toxicity. *Mol Cell* **8**:233-43.
153. **Sizova, I., M. Fuhrmann, and P. Hegemann.** 2001. A *Streptomyces rimosus* aphVIII gene coding for a new type phosphotransferase provides stable antibiotic resistance to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Gene* **277**:221-9.
154. **Sodeinde, O. A., and K. L. Kindle.** 1993. Homologous recombination in the nuclear genome of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:9199-203.
155. **Srivastava, V., O. D. Anderson, and D. W. Ow.** 1999. Single-copy transgenic wheat generated through the resolution of complex integration patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:11117-21.
156. **Srivastava, V., and D. W. Ow.** 2004. Marker-free site-specific gene integration in plants. *Trends Biotechnol* **22**:627-9.
157. **Steimer, A., P. Amedeo, K. Afsar, P. Fransz, O. Mittelsten Scheid, and J. Paszkowski.** 2000. Endogenous targets of transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**:1165-78.
158. **Sternberg, N., and D. Hamilton.** 1981. Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J Mol Biol* **150**:467-86.
159. **Sternberg, N., D. Hamilton, and R. Hoess.** 1981. Bacteriophage P1 site-specific recombination. II. Recombination between loxP and the bacterial chromosome. *J Mol Biol* **150**:487-507.
160. **Stevens, D. R., J. D. Rochaix, and S. Purton.** 1996. The bacterial phleomycin resistance gene *ble* as a dominant selectable marker in *Chlamydomonas*. *Mol Gen Genet* **251**:23-30.
161. **Studier, F. W., and B. A. Moffatt.** 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**:113-30.

162. **Swanson, J. A., M. Lee, and P. E. Knapp.** 1991. Cellular dimensions affecting the nucleocytoplasmic volume ratio. *J Cell Biol* **115**:941-8.
163. **Szostak, J. W., T. L. Orr-Weaver, R. J. Rothstein, and F. W. Stahl.** 1983. The double-strand-break repair model for recombination. *Cell* **33**:25-35.
164. **Takahashi, Y., M. Goldschmidt-Clermont, S. Y. Soen, L. G. Franzen, and J. D. Rochaix.** 1991. Directed chloroplast transformation in *Chlamydomonas reinhardtii*: insertional inactivation of the *psaC* gene encoding the iron sulfur protein destabilizes photosystem I. *Embo J* **10**:2033-40.
165. **Tam, L. W., and P. A. Lefebvre.** 1993. Cloning of flagellar genes in *Chlamydomonas reinhardtii* by DNA insertional mutagenesis. *Genetics* **135**:375-84.
166. **Terada, R., H. Asao, and S. Iida.** 2004. A large-scale Agrobacterium-mediated transformation procedure with a strong positive-negative selection for gene targeting in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Rep* **22**:653-9.
167. **Terada, R., H. Urawa, Y. Inagaki, K. Tsugane, and S. Iida.** 2002. Efficient gene targeting by homologous recombination in rice. *Nat Biotechnol* **20**:1030-4.
168. **Thyagarajan, B., M. J. Guimaraes, A. C. Groth, and M. P. Calos.** 2000. Mammalian genomes contain active recombinase recognition sites. *Gene* **244**:47-54.
169. **Thykjaer, T., J. Finnemann, L. Schauser, L. Christensen, C. Poulsen, and J. Stougaard.** 1997. Gene targeting approaches using positive-negative selection and large flanking regions. *Plant Mol Biol* **35**:523-30.
170. **Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**:4350-4.
171. **Vaucheret, H., and M. Fagard.** 2001. Transcriptional gene silencing in plants: targets, inducers and regulators. *Trends Genet* **17**:29-35.
172. **Wang, Y., B. Chen, Y. Hu, J. Li, and Z. Lin.** 2005. Inducible excision of selectable marker gene from transgenic plants by the cre/lox site-specific recombination system. *Transgenic Res* **14**:605-14.
173. **Watson, J. C., and S. J. Surzycki.** 1982. Extensive sequence homology in the DNA coding for elongation factor Tu from *Escherichia coli* and the *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**:2264-7.
174. **Wessler, S. R.** 1998. Transposable elements and the evolution of gene expression. *Symp Soc Exp Biol* **51**:115-22.
175. **Wierzbicki, A., M. Kendall, K. Abremski, and R. Hoess.** 1987. A mutational analysis of the bacteriophage P1 recombinase Cre. *J Mol Biol* **195**:785-94.
176. **Wolffe, A. P., and M. A. Matzke.** 1999. Epigenetics: regulation through repression. *Science* **286**:481-6.
177. **Woods, K. C., S. S. Martin, V. C. Chu, and E. P. Baldwin.** 2001. Quasi-equivalence in site-specific recombinase structure and function: crystal structure and activity of trimeric Cre recombinase bound to a three-way Lox DNA junction. *J Mol Biol* **313**:49-69.
178. **Zhang, A. H., and G. Q. Liu.** 2004. [Application of RNAi technology to knockdown gene expression in vivo in mammals]. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan* **35**:125-9.
179. **Zorin, B., P. Hegemann, and I. Sizova.** 2005. Nuclear-gene targeting by using single-stranded DNA avoids illegitimate DNA integration in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot Cell* **4**:1264-72.



## 8 ANLAGEN

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

Alle verwendeten physikalischen Größen wurden in SI-Einheiten angegeben.

<b>Ac-Element</b>	<i>Activator</i> -Element
<b>AK</b>	Antikörper
<b>Amp</b>	Ampicillin
<b>AP</b>	Alkalische Phosphatase
<b>AphVIII</b>	Aminoglykosid-3'-Phosphotransferase
<b><i>aphVIII</i>, <i>aph7''</i></b>	Aminoglykosid-3'-Phosphotransferasegen
<b><i>ARG7.8</i></b>	Argininosuccinatlyasegen
<b>As</b>	Aminosäure
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>BCIP</b>	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
<b>Betain</b>	N,N,N-Trimethylglycin-Monohydrat
<b><i>bla</i></b>	Ampicillinresistenzgen
<b><i>ble</i>, <i>Ble</i></b>	Bleomycinresistenzgen, Bleomycinbindepotein
<b>bp</b>	Basenpaar
<b><i>C. reinhardtii</i></b>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
<b><i>ccre</i></b>	an die „Codon Usage“ von <i>C. reinhardtii</i> angepasstes Cre-Rekombinasegen
<b><i>cgfp</i></b>	an die „Codon Usage“ von <i>C. reinhardtii</i> angepasstes Gen für das grün fluoreszierende Protein
<b><i>cgluc</i></b>	an die „Codon Usage“ von <i>C. reinhardtii</i> angepasstes Gen für die <i>Gaussia</i> -Luciferase
<b>CIP</b>	Calf Intestinal Phosphatase
<b><i>cre</i>, <i>Cre</i></b>	Cre-Rekombinasegen, Cre-Rekombinase
<b><i>crluc</i></b>	an die „Codon Usage“ von <i>C. reinhardtii</i> angepasstes Gen für die <i>Renilla</i> -Luciferase
<b><i>CSE</i></b>	Cre-Selbsteliminierung
<b><i>D. melanogaster</i></b>	<i>Drosophila melanogaster</i>
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	bidestilliertes Wasser
<b>DNA</b>	deoxyribonucleic acid = Desoxyribonukleinsäure
<b>dNTP</b>	deoxyribonucleotide triphosphate = Desoxyribonukleotidtriphosphat
<b><i>Ds</i>-Element</b>	<i>Dissoziation</i> -Element
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz
<b>ERG</b>	Eppendorfreaktionsgefäß
<b><i>G. princeps</i></b>	<i>Gaussia princeps</i>
<b>GFP</b>	Grün fluoreszierendes Protein aus
<b>His</b>	Histidin
<b>HR/NHR</b>	Homologe Rekombination/ Nichthomologe Rekombination

<b>HSP</b>	Gen für Hitzeschockprotein (heat shock protein)
<b>In</b>	Intronsequenz aus dem <i>RBCS2</i> -Gen
<b>IPTG</b>	Isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galaktosid
<b>IS</b>	Insertionselement
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>lacZ</b>	Gen für $\beta$ -Galaktosidase
<b>LB</b>	Luria-Bertani-Medium
<b>lox</b>	locus of crossing over
<b>mRNA</b>	messenger ribonucleic acid = Boten RNA
<b>MW</b>	Molecular weight = Molekulargewicht
<b>NBT</b>	Nitroblautetrazolium
<b>nls</b>	nuclear localization signal = Kernlokalisierungssignal
<b>OD</b>	optische Dichte
<b>ON</b>	Oligonukleotid
<b>PAGE</b>	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<b>PBS</b>	phosphate-buffered saline = phosphat-gepufferte Salzlösung
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction = Polymerasekettenreaktion
<b>Phe</b>	Phenylalanin
<b>Pm</b>	Paromomycin
<b>PTGS</b>	posttranscriptional gene silencing
<b><i>R. reniformis</i></b>	<i>Renilla reniformis</i>
<b>RAD</b>	Protein für homologe Rekombination in Eukaryonten
<b>RBCS2</b>	Gen der kleinen Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase-Oxygenase
<b>REC</b>	Gen für Rekombinase
<b>rLuc</b>	<i>Renilla</i> -Luciferase
<b>RMCE</b>	recombinase mediated cassette exchange = Rekombinase-vermittelter Kassettenaustausch
<b>RNA</b>	ribonucleic acid = Ribonukleinsäure
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b><i>S. cerevisiae</i></b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<b>SDS</b>	Sodiumdodecylsulfate = Natriumdodekylsulfat
<b>TAP</b>	Tris-Acetat-Phosphat-Medium
<b>Taq</b>	Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
<b>TGS</b>	transcriptional gene silencing
<b>Tn</b>	Transposon
<b><i>TOC1</i></b>	transposon of <i>Chlamydomonas</i>
<b>Tris</b>	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
<b>Trp</b>	Tryptophan
<b>Tyr</b>	Tyrosin
<b>ÜN</b>	über Nacht
<b>UTR</b>	untranslated region = nichttranslatierte Region
<b>X-Gal</b>	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactosid

## 8.2 Oligonukleotide

### Oligonukleotide für PCR-und Hybridisierungsreaktionen

Die Oligonukleotide wurden bei Metabion entsalzt und lyophilisiert bestellt, die Endkonzentration betrug 50pmol/µl gelöst in ddH<sub>2</sub>O.

Oligonukleotide	Sequenz 5'→3'
<b>aph1</b>	CTC AGC CTC ACC CAA CAA GC
<b>aph2</b>	GAA TCC CCA CCT CCG CCA AC
<b>APHfw</b>	ATC TCG AGA TGG ACG ATG CGT TGC GTG
<b>APHrev</b>	ATG GAT CCT CAG AAG AAC TCG TCC AAC AG
<b>aphSonrev</b>	CAG CAC GTT GTC CGG GCA C
<b>blePstIrev</b>	AAA CTG CAG GTC CTG CTC CTC GGC CAC
<b>bleXhoIfw</b>	AAA CTC GAG ATG GCC AAG CTG ACC AGC
<b>blecdncrerev</b>	GCA CGG TCA GCA GGT TGC TGT CCT GCT CCT CGG CCA C
<b>bleEnde fw</b>	GTG CAC TTC GTG GCC GAG
<b>Bre 2</b>	GGT GTA CGG TCA GTA AAT TGG AGT CCT GCT CCT CGG CCA CGA AG
<b>Bre 3</b>	ATC CAT GGC CAA GCT GAC CAG CG
<b>Bre1</b>	CAC TTC GTG GCC GAG GAG CAG GAC TCC AAT TTA CTG ACC GTA CAC
<b>Bre4</b>	ATA CGC GTT GCC GTT GTT CGA GCC GTC CTG CTC CTC GGC CA C
<b>Bre5</b>	ATA CGC GTC GGG CAA CAA CTC CGG CGG TTC CAA TTT ACT GAC CGT ACA C
<b>cdn.cre1rev</b>	CTC CAT CAG GGA GCG CAC CTG GTC AAA ATC GGT CCG
<b>cdn.cre2fw</b>	GAG CGG ACC GAT TTT GAC CAG GTG CGC TCC CTG ATG GAG
<b>cdncreblefw</b>	CGT GGC CGA GGA GCA GGA CAG CAA CCT GCT GAC CGT GC
<b>cdncrelinkfw</b>	GGC AAC AAC TCC GGC GGT AGC AAC CTG CTG ACC GTG C
<b>Chlcre1rev</b>	GCA ACC CCG CAA GCT CAC C
<b>Chlcre2rev</b>	GGA TCC TCA GTC GCC GTC C
<b>Cre1</b>	ATC CAT GGT GCC GAA AAA GAA ACG CAA AGT GTC CAA TTT ACT GAC CGT ACA C
<b>Cre2</b>	TAC TCG AGT TAG TGA TGA TGA TGA TGA TGA TCG CCT ACT TCC AGC AGG
<b>cre2/Sma-fw</b>	ATC CCG GGT GGG CGC TGC CCG CG
<b>Cre2M</b>	CGG TTA TTC AAC TTG CAC CAT GC
<b>CreAnfw</b>	ATG CTT CTG TCC GTT TGC CG
<b>Crebamrev</b>	ATG GAT CCC TAA TCG CCA TCT TCC AGC AG
<b>CreMitfw</b>	CTG GTT AGC ACC GCA GGT G
<b>CreMitrev</b>	CAG GCT AAG TGC CTT CTC TAC
<b>CreMutfw</b>	CGT GAT GAA CT T CAT CCG GAA CCT GGA CTC
<b>CreMutrev</b>	GTT CCG GAT G A A GTT CAT CAC GAT ATT CAC G

# ANLAGEN

Oligonukleotide	Sequenz 5'→3'
<b>Crexhofw</b>	ATC <u>TCG AGA</u> TGT CCA ATT TAC TGA CCG TAC
<b>GFPlink</b>	ATA CGC GTT GCC GTT GTT CGA GCC CTT GTA CAG CTC GTC CAT GC
<b>GFPNls</b>	ATC CAT GGT GCC GAA AAA GAA ACG CAA AGT GGC CAA GGG CGA GGA GCT G
<b>hisHindIIIrev</b>	ATA <u>AGC TTT</u> TAG TGA TGA TGA TGA TGA TGA TCG
<b>hsprev</b>	ATC ATG TCA AGC CTC AGC
<b>HSV1</b>	GGC CAG CCA GCC GGA GCT GGC CCC G
<b>Int2fw</b>	GTG AGC TTG CGG GGT TGC
<b>Int2rev</b>	CTG CAA GCA AGG GGA TGA AG
<b>Int3rev</b>	CTG CGG GCG CAC GGG AAA TGG
<b>linkedncrev</b>	GCA CGG TCA GCA GGT TGC TAC CGC CGG AGT TGT TGC C
<b>loxAC53</b>	AAT TCA TAA CTT CGT ATA <u>AAG TAT CCT</u> ATA CGA AGT TAT G
<b>loxCT35</b>	AAT TCA TAA CTT CGT ATA <u>GTA CAC ATT</u> ATA CGA AGT TAT G
<b>loxGA53</b>	AAT TCA TAA CTT CGT ATA <u>ATG TGT ACT</u> ATA CGA AGT TAT G
<b>loxP35</b>	AAT TCA TAA CTT CGT ATA <u>GCA TAC ATT</u> ATA CGA AGT TAT G
<b>loxP53</b>	AAT TCA TAA CTT CGT ATA <u>ATG TAT GCT</u> ATA CGA AGT TAT G
<b>loxTG35</b>	AAT TCA TAA CTT CGT ATA <u>GGA TAC TTT</u> ATA CGA AGT TAT G
<b>Luc-fw</b>	AGC AAG GTG TAC GAC CCC GAG C
<b>Luc-rev</b>	ATC GTT CTT CAG CAC GCG CTC C
<b>nlsEcoRIfw</b>	<u>ATG AAT TCG</u> TGC CGA AAA AGA AAC GCA AAG
<b>pETrev</b>	CTA CCG CAT TAA AGC TTA TCG
<b>PSPfw</b>	TGC CCT CCT GAT AAA CCG GCC
<b>rbcs2_I1fw</b>	GTG AGT CGA CGA GCA AGC CCG GC
<b>rbcs2_I1rev1</b>	CTG CAA ATG GAA ACG GCG ACG A
<b>rbcs2_I2fw</b>	GTG AGC TTG CGG GGT TGC GAG CA
<b>rbcs2_I2rev</b>	CTG CAA GCA AGG GGA TGA AGG GT
<b>rbcs2_I3fw</b>	GTA AGT CTG GCG AGA GCC CGA CG
<b>rbcs2_I3rev2</b>	CTG CGG GCG CAC GGG AAA TGG GA
<b>RI1f14</b>	AAG ATG TTC ATC GAG AGC GAC CCC GGC TTC TTC AGC AAC GCC ATC GTG GAG
<b>reverse</b>	CAG GAA ACA GCT ATG AC
<b>RLuc(PstI)fw</b>	AAA <u>CTG CAG</u> GCC AGC AAG GTG TAC GAC CCC GA
<b>T3</b>	ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA
<b>T7</b>	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
<b>universal</b>	GTA AAA CGA CGG CCA GT
<b>„linker“</b>	GGC TCG AAC AAC GGC <u>AAC GCG TCG</u> GGC AAC AAC TCC GGC GGT

**Abb. 8.2-a Verwendete Oligonukleotide.** Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme sind unterstrichen, substituierte Nukleotide zur Einführung einer Punktmutation grau hinterlegt und „spacer“-Region der *lox*-Elemente eingerahmt dargestellt.

## Oligonukleotide für die Gensynthese

Die Oligonukleotide für die Gensynthese wurden bei Metabion in HPLC-gereinigter Form und lyophilisiert bestellt, sie wurden ad 100pmol/μl gelöst in ddH<sub>2</sub>O.

Oligonukleotid	Sequenz 5'→3'
----------------	---------------

### ccre1-Teil

<b>cr1fw1</b>	CTC GAG ATG GTC CCC AAG AAG AA
<b>cr1fw2</b>	GCG CAA GGT CAG CAA CCT GCT GAC CGT GCA CCA GAA TCT GCC CG
<b>cr1fw3</b>	CCC TCC CCG TGG ACG CCA CCT CCG ACG AGG TGC GCA AGA ACC
<b>cr1fw4</b>	TGA TGG ACA TGT TCC GGG ATC GCC AGG CCT TTT CCG AGC ACA CGT
<b>cr1fw5</b>	GGA AGA TGC TGC TGT CCG TGT GCC GCA GCT GGG CGG CGT GG
<b>cr1fw6</b>	TGC AAG CTG AAC AAC CGC AAG TGG TTC CCC GCG GAA CCC GAG G
<b>cr1fw7</b>	ACG TGC GCG ACT ACC TGC TGT ACC TGC AGG CCC GTG GCC TCG
<b>cr1fw8</b>	CGG TGA AGA CCA TCC AGC AGC ATC TGG GCC AGC TGA ACA TGC TG
<b>cr1fw9</b>	CAC CGC CGC TCC GGT CTC CCC CGG CCG TCC GAC TCC AAC G
<b>cr1fw10</b>	CCG TGA GCC TGG TGA TGC GCC GCA TTC GGA AGG AGA ATG TC GAC
<b>cr1fw11</b>	GCG GGT GAG CGC GCC AAG CAG GCC CTG GCG TTC GAG CGG A
<b>cr1fw12</b>	CCG ATT TTG ACC AGG TGA GCT TGC GGG GTT GC
<b>cr1rev1</b>	CAG CAG GTT GCT GAC CTT GCG CTT CTT CTT GGG GAC CAT CTC GAG
<b>cr1rev2</b>	GGT GGC GTC CAC GGG GAG GGC GGG CAG ATT CTG GTG CAC GGT
<b>cr1rev3</b>	GCG ATC CCG GAA CAT GTC CAT CAG GTT CTT GCG CAC CTC GTC GGA
<b>cr1rev4</b>	CAC ACG GAC AGC AGC ATC TTC CAC GTG TGC TCG GAA AAG GCC TG
<b>cr1rev5</b>	CAC TTG CGG TTG TTC AGC TTG CAC CAC GCC GCC CAG CTG CGG
<b>cr1rev6</b>	TAC AGC AGG TAG TCG CGC ACG TCC TCG GGT TCC GCG GGG AAC
<b>cr1rev7</b>	TGC TGC TGG ATG GTC TTC ACC GCG AGG CCA CGG GCC TGC AGG
<b>cr1rev8</b>	GGG AGA CCG GAG CGG CGG TGC AGC ATG TTC AGC TGG CCC AGA
<b>cr1rev9</b>	GGC GCA TCA CCA GGC TCA CGG CGT TGG AGT CGG ACG GCC GG
<b>cr1rev10</b>	TGC TTG GCG CGC TCA CCC GCG TCG ACA TTC TCC TTC CGA ATG C
<b>cr1rev11</b>	GCA ACC CCG CAA GCT CAC CTG GTC AAA ATC GGT CCG CTC GAA CGC CAG GGC C

Oligonukleotid	Sequenz 5'→3'
<b><u>ccre2-Teil</u></b>	
<b>cr2fw1</b>	TCA TCC CCT TGC TTG CAG GTG C
<b>cr2fw2</b>	GCT CCC TGA TGG AGA ATT CCG ACC GCT GCC AGG ATA TCC GCA A
<b>cr2fw3</b>	CCT GGC GTT CCT GGG TAT CGC GTA CAA CAC CCT GCT GCG CAT C
<b>cr2fw4</b>	GCG GAG ATC GCC CGC ATC CGG GTG AAG GAC ATT TCC CGC ACG
<b>cr2fw5</b>	GAC GGC GGC CGC ATG CTG ATT CAC ATC GGC CGC ACC AAG AC
<b>cr2fw6</b>	CCT GGT GAG CAC GGC GGG CGT GGA GAA GGC CCT GTC CCT G
<b>cr2fw7</b>	GGT GTC ACC AAG CTG GTG GAG CGC TGG ATC TCC GTG AGC GG
<b>cr2fw8</b>	CGT GGC GGA CGA CCC CAA CAA CTA TCT GTT CTG TCG CGT CCG
<b>cr2fw9</b>	CAA GAA CGG CGT GGC CGC CCC CTC CGC CAC CTC CCA GCT C
<b>cr2fw10</b>	AGC ACG CGG GCG CTG GAG GGC ATT TTC GAG GCG ACC CAC C
<b>cr2fw11</b>	GGC TCA TCT ACG GCG CGA AGG ACG ACT CCG GCC AGC GCT AC
<b>cr2fw12</b>	CTC GCC TGG TCC GGC CAC AGC <u>GCC CGG</u> GTG GGC GCT GC
<b>cr2fw13</b>	CCG CGA CAT GGC CCG AGC CGG CGTC TCC ATC CCC GAG ATC
<b>cr2fw14:</b>	ATG CAG GCG GGC GGC TGG ACG AAC GTG AAT ATC GTG ATG AAC TAC
<b>cr2fw15:</b>	ATC CGG AAC CTG GAC TCC GAG ACC GGC GCG ATG GTG CGC C
<b>cr2fw16:</b>	TGC TGG AGG ACG GCG ACT <u>GAG GAT CC</u>
<b>cr2rev1</b>	TCG GAA TTC TCC ATC AGG GAG CGC ACC TGC AAG CAA GGG GAT GA
<b>cr2rev2</b>	GCG ATA CCC AGG AAC GCC AGG TTG CGG ATA TCC TGG CAG CGG
<b>cr2rev3</b>	CGG ATG CGG GCG ATC TCC GCG ATG CGC AGC AGG GTG TTG TAC
<b>cr2rev4</b>	ATC AGC ATG CGG CCG CCG TCC GTG CGG GAA ATG TCC TTC ACC
<b>cr2rev5</b>	GCC CGC CGT GCT CAC CAG GGT CTT GGT GCG GCC GAT GTG A
<b>cr2rev6</b>	CTC CAC CAG CTT GGT GAC ACC CAG GGA CAG GGC CTT CTC CAC
<b>cr2rev7</b>	TGT TGG GGT CGT CCG CCA CGC CGC TCA CGG AGA TCC AGC G
<b>cr2rev8</b>	GGG CGG CCA CGC CGT TCT TGC GGA CGC GAC AGA ACA GAT AGT
<b>cr2rev9</b>	CCT CCA GCG CCC GCG TGC TGA GCT GGG AGG TGG CGG AGG
<b>cr2rev10</b>	CCT TCG CGC CGT AGA TGA GCC GGT GGG TCG CCT CGA AAA TGC
<b>cr2rev11</b>	CTG TGG CCG GAC CAG GCG AGG TAG CGC TGG CCG GAG TCG T
<b>cr2rev12</b>	GGC TCG GGC CAT GTC GCG GGC AGC GCC <u>CAC CCG GGC</u> G
<b>cr2rev13</b>	GTC CAG CCG CCC GCC TGC ATG ATC TCG GGG ATG GAG ACG CC
<b>cr2rev14</b>	CTC GGA GTC CAG GTT CCG GAT GTA GTT CAT CAC GAT ATT CAC GTT C
<b>cr2rev15</b>	<u>GGA TCC</u> TCA GTC GCC GTC CTC CAG CAG GCG CAC CAT CGC GCC GGT

### 8.3 „graphical codon usage analyzer“-für *cre*- und *ccre*-Gen

Vergleich der relativen Häufigkeit von verwendeten Codons: *cre*-Sequenz (P1)  $\leftrightarrow$  *C. reinhardtii*-Genom.

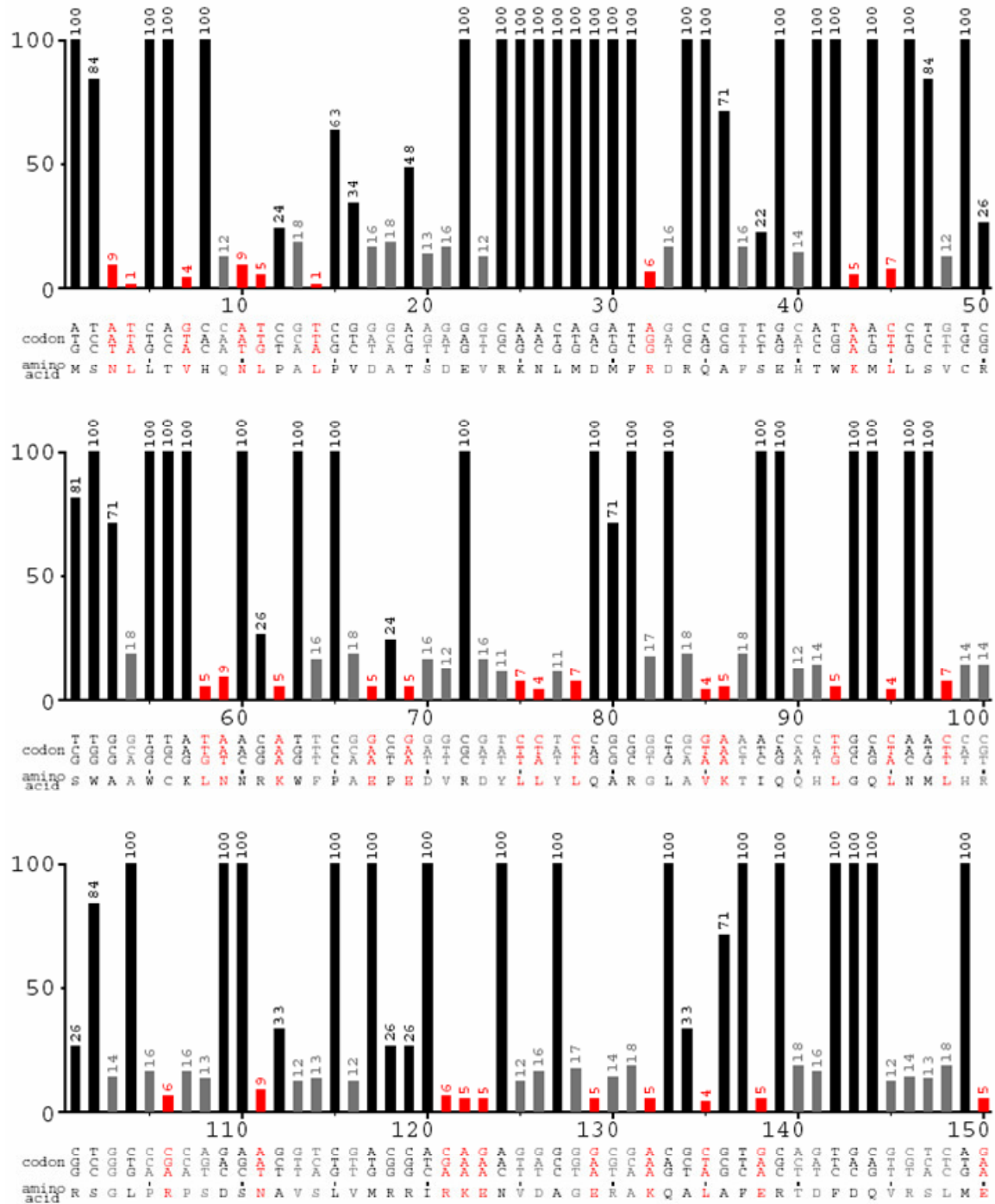
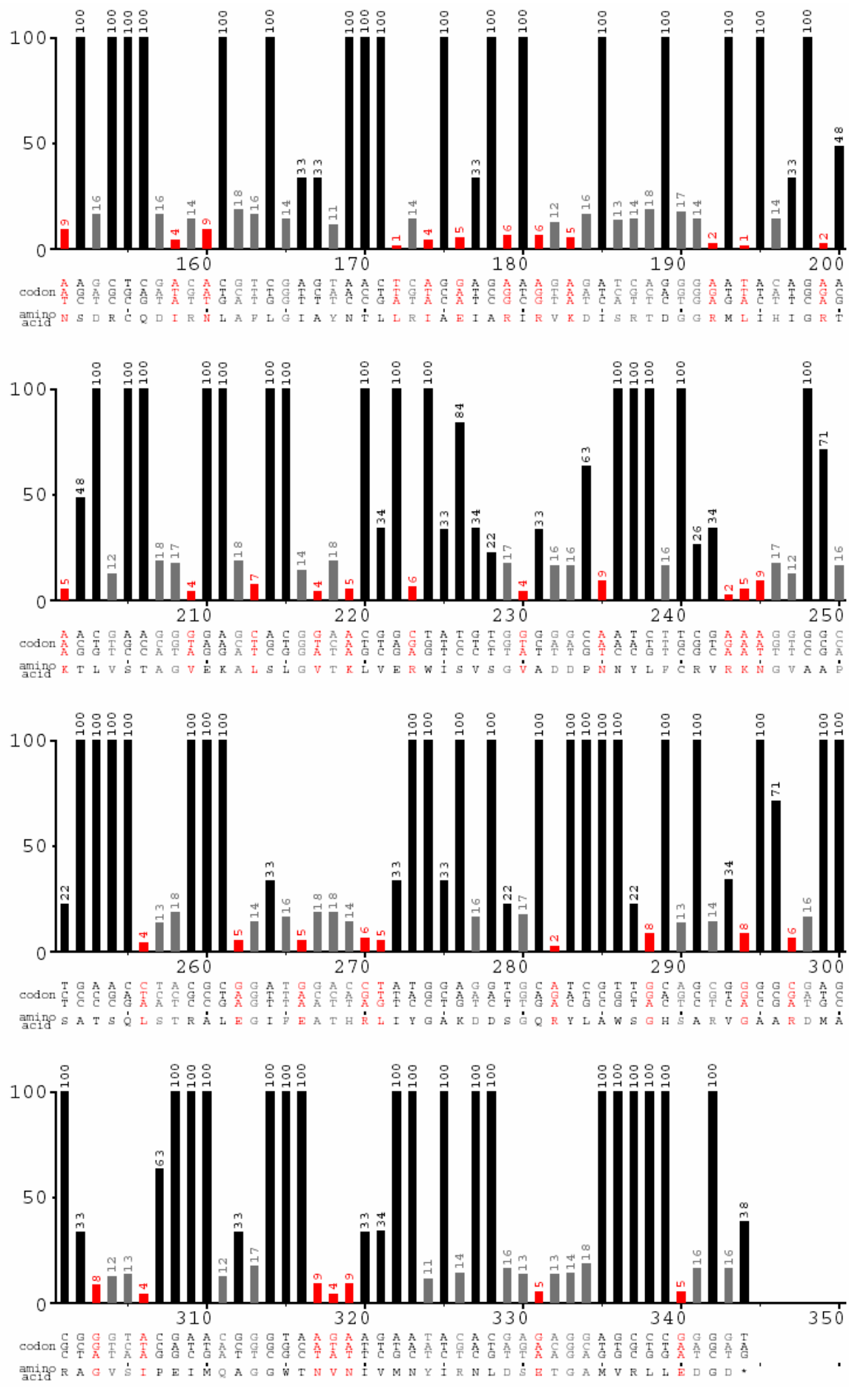


Abb. 8.3-a Graphische Darstellung der Codons 1-344: relative Häufigkeit bis 10 (roter Balken), bis 20 (dunkelgrauer Balken) und größer als 20 (schwarzer Balken).









## 8.4 Vergleich von DNA-Sequenzen mit dem Programm „DNAMAN“

```

1      ATGTCCAATTTACTGACCGTACACCAAAATTTGCCTGCATTACCGGTCGATGCAACGAGT
    |||  |||  | ||||| ||||| ||| ||| | ||| ||| ||| |||
1      ATGAGCAACCTGCTGACCGTGACCAGAATCTGCCCGCCCTCCCGTGGACGCCACCTCC
1      M S N L L T V H Q N L P A L P V D A T S
61     GATGAGGTTTCGCAAGAACCTGATGGACATGTTTCAGGGATCGCCAGGCGTTTTCTGAGCAT
    || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
61     GACGAGGTGCGCAAGAACCTGATGGACATGTTCCGGGATCGCCAGGCGTTTTCCGAGCAC
21     D E V R K N L M D M F R D R Q A F S E H
121    ACCTGGAAAATGCTTCTGTCCGTTTGCCGGTCGTGGGCGGCATGGTGCAAGTTGAATAAC
    || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||
121    ACGTGGAAGATGCTGCTGTCCGTGTGCCGCAGCTGGGCGGCGTGGTGCAAGCTGAACAAC
41     T W K M L L S V C R S W A A W C K L N N
181    CGGAAATGGTTTTCCCGCAGAACCTGAAGATGTTTCGCGATTATCTTCTATATCTTCAGGCG
    || || ||||| ||||| ||||| || || ||||| || || || || || || || || || || ||
181    CGCAAGTGGTTCCCGCGGAACCCGAGGACGTGCGCGACTACCTGCTGTACCTGCAGGCC
61     R K W F P A E P E D V R D Y L L Y L Q A
241    CGCGGTCTGGCAGTAAAACTATCCAGCAACATTTGGGCCAGCTAAACATGCTTCATCGT
    || || || || || || || || ||||| || || ||||| || ||||| || || || || || ||
241    CGTGGCCTCGCGGTGAAGACCATCCAGCAGCATCTGGGCCAGCTGAACATGCTGCACCGC
81     R G L A V K T I Q Q H L G Q L N M L H R
301    CGGTCCGGGCTGCCACGACCAAGTGACAGCAATGCTGTTTCACTGGTTATGCGGCGGATC
    || ||||| || || || || || || || || || || || || || || || || || || || ||
301    CGTCCGGTCTCCCCGGCGCTCCGACTCCAACGCCGTGAGCCTGGTGATGCGCGCGATT
101    R S G L P R P S D S N A V S L V M R R I
361    CGAAAAGAAAACGTTGATGCCGGTGAACGTGCAAAACAGGCTCTAGCGTTCGAACGCACT
    || || || || || || || || ||||| || || || ||||| || ||||| || || || || || ||
361    CGGAAGGAGAATGTGACGCGGGTGAGCGCGCCAAGCAGGCCCTGGCGTTCGAGCGGACC
121    R K E N V D A G E R A K Q A L A F E R T
421    GATTTGACCAGGTTCGTTCACTCATGGAAAATAGCGATCGCTGCCAGGATATACGTAAT
    ||||| ||||| || || || ||||| || || || ||||| || ||||| || || || || || ||
421    GATTTTGACCAGGTGCGCTCCCTGATGGAGAATTCGACCGCTGCCAGGATATCGCAAC
141    D F D Q V R S L M E N S D R C Q D I R N
481    CTGGCATTCTGGGGATTGCTTATAACACCCTGTTACGTATAGCCGAAATTGCCAGGATC
    ||||| || ||||| || || || ||||| || || || || || || || || || || || || ||
481    CTGGCGTTCCTGGGTATCGGTACAACACCCTGTGCGCATCGCGGAGATCGCCCGCATC
161    L A F L G I A Y N T L L R I A E I A R I
541    AGGGTTAAAGATATCTCACGTACTGACGGTGGGAGAATGTTAATCCATATTGGCAGAACG
    ||||| || || || || || || || ||||| || || || || || || || || || || || ||
541    CGGGTGAAGGACATTTCCCGCACGGACGGCGGCCGCATGCTGATTACATCGGCCGCACC
181    R V K D I S R T D G G R M L I H I G R T

```

```

601  AAAACGCTGGTTAGCACCGCAGGTGTAGAGAAGGCACCTTAGCCTGGGGGTAACATAACTG
    || || ||||| ||||| || || || ||||| || || || || ||
601  AAGACCCTGGTGAGCACGGCGGGCGTGGAGAAGGCCCTGTCCCTGGGTGTCACCAAGCTG
201  K T L V S T A G V E K A L S L G V T K L
661  GTCGAGCGATGGATTTCCGTCTCTGGTGTAGCTGATGATCCGAATAACTACCTGTTTTGC
    || ||||| ||||| ||||| || || || || || || || || || || ||
661  GTGGAGCGCTGGATCTCCGTGAGCGGGCGTGGCGGACGACCCCAACAACATCTGTTCTGT
221  V E R W I S V S G V A D D P N N Y L F C
721  CGGGTCAGAAAAATGGTGTGCGCGCCATCTGCCACCAGCCAGCTATCAACTCGCGCC
    || ||| || || || || || ||||| || || ||||| ||||| || || ||
721  CGCGTCCGCAAGAACGGCGTGGCCGCCCCCTCCGCCACCTCCAGCTCAGCACGCGGGCG
241  R V R K N G V A A P S A T S Q L S T R A
781  CTGAAGGGATTTTTGAAGCAACTCATCGATTGATTTACGGCGCTAAGGATGACTCTGGT
    ||||| || ||||| || || || || || || || ||||| ||||| ||||| ||
781  CTGGAGGGCATTTTTGAGGCGACCCACCGGCTCATCTACGGCGCGAAGGACGACTCCGGC
261  L E G I F E A T H R L I Y G A K D D S G
841  CAGAGATACCTGGCCTGGTCTGGACACAGTGCCCGTGTCTGGAGCCGCGCGAGATATGGCC
    ||| | ||||| ||||| || ||||| ||||| || || || || || |||||
841  CAGCGCTACCTCGCCTGGTCCGGCCACAGCGCCCGGGTGGCGCTGCCCGCGACATGGCC
281  Q R Y L A W S G H S A R V G A A R D M A
901  CGCGCTGGAGTTTCAATACCGAGATCATGCAAGCTGGTGGCTGGACCAATGTAAATATT
    || || || || || || || ||||| || || ||||| || || |||||
901  CGAGCCGGCGTCTCCATCCCCGAGATCATGCAGGCGGGGGCTGGACGAACGTGAATATC
301  R A G V S I P E I M Q A G G W T N V N I
961  GTCATGAACATATCCGTAACCTGGATAGTGAAACAGGGGCAATGGTGCGCTGCTGGAA
    || ||||| ||||| ||||| || || || || ||||| ||||| |||||
961  GTGATGAACATATCCGGAACCTGGACTCCGAGACCGCGCGATGGTGCGCTGCTGGAG
321  V M N Y I R N L D S E T G A M V R L L E
1021 GATGGCGATTAG
    || ||||| |
1021 GACGGCGACTGA
341  D G D *

```

**Abb. 8.4-a Vergleich der Sequenzen mit DNAMAN.** Obere Reihe: *cre*-Gen (Bakteriophage P1), mittlere Reihe: *ccre*-Gen (cdn.-optimiert für *C. reinhardtii*), untere Reihe: resultierende Aminosäuresequenz. Basensubstitutionen zur Codonoptimierung sind grau hinterlegt.

## EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

---

Die vorliegende Arbeit wurde am Kompetenzzentrum für fluoreszente Bioanalytik der Universität Regensburg in der Zeit von April 2003 bis Juni 2007 unter der Betreuung von Prof. Dr. P. Hegemann angefertigt.

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Marion Mägdefrau

Regensburg, 5.6.2007

---

## Lebenslauf

### Persönliche Angaben

Name	Marion Mägdefrau
Geburtsdatum	11.02.1978
Geburtsort	Berlin Pankow
Familienstand	verheiratet

### Schulausbildung

1984-1991, Allgemeine polytechnische Oberschule  
1991-1997, Gesamtschule mit gymnasialer Obersufe  
(Allgemeine Hochschulreife)

### Akademischer Werdegang

Studium	1997-2003, Studium der Lebensmittelchemie an der TU-Berlin, Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. U. Szewzyk und Betreuung durch Dr. E. Grohmann an der TU-Berlin zum Thema: „Untersuchung zur Regulation der Transfgene am Beispiel des konjugativen Plasmids pIP501“
---------	---

### Promotionsstudium

2003-2007, Dissertation unter Anleitung von Prof. Dr. P. Hegemann an der Universität Regensburg  
(Betreuung durch Dr. M. Fuhrmann am KFB Regensburg vom 1.4.2003-31.10.2005) und  
an der HU-Berlin (Betreuung durch Dr. M. Heitzer am KFB Regensburg vom 1.11.2005-31.3.2007) zum Thema:  
“Ortsgerichtete Rekombination in *Chlamydomonas reinhardtii* am Beispiel des Cre/lox-Systems“

### Berufstätigkeit

1999-2005, Aushilfstätigkeit bei Esprit  
1.4.2007-31.11.2007 Anstellung an der Universität Regensburg/ KFB als Wissenschaftliche Mitarbeiterin

## *Und nun das Beste zum Schluss - Die Danksagung!*

*An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater- Prof. Dr. Peter Hegemann- bedanken, der mir sowohl die Durchführung dieser Promotion an der Universität-Regensburg als auch an der HU-Berlin ermöglichte. (An dieser Stelle auch ein Dank an Frau Piater und Herrn Gossila, die des Öfteren mit meiner Personalstelle beschäftigt waren). Auch die Ermöglichung des Doktorandentreffens (Forschergruppe) in Berlin sowie die Teilnahme am Chlamy-Meeting 2007 in Portland wären ohne Peters Unterstützung nicht möglich gewesen.*

*Des Weiteren möchte ich mich bei Markus F. für die Betreuung zu Beginn der Arbeit bedanken sowie bei Peter und bei Markus H. für die Unterstützung während der gesamten Promotion. Durch Markus H. habe ich nicht nur viel über Chlamy, sondern auch eine Menge über molekularbiologisches Arbeiten gelernt, insbesondere über meine Art zu arbeiten. Einen großen Dank für die Hilfe im Labor, beim Posterdrucken in Jena und beim Korrekturlesen dieser Arbeit, was sicher jedes Mal Nerven gekostet hat.*

*Ebenfalls möchte ich mich bei allen Ehemaligen der Algenbiotech-Gruppe (nicht zu vergessen Christoph und Regina) für die schöne Zeit im KFB bedanken. Einen Dank auch an Berti & Sabina! Alke möchte ich für viele lustige, aber auch lehrreiche Unterhaltungen im und außerhalb des Labors danken sowie für die witzige Fehlerkorrektur (endlich mal etwas zum Lachen) und die vielen aufmunternden e-mails!*

*Bei Meike möchte ich mich für das offene Ohr bedanken, welches ich in den letzten Monaten des Öfteren benötigte und für die Aufrechterhaltung aller lebenswichtigen Funktionen meiner Chlamy-Kulturen. Auch Ovidiu und den verbleibenden KFB-lern möchte ich dafür danken, dass ich mich komplett auf das Zusammenschreiben meiner Arbeit konzentrieren konnte und vom Laboralltag befreit war. Einen Dank auch an die IFG-ler für viele erheiternde Worte und lustige Abende in geselliger Runde, die ich so schnell wohl nicht vergessen werde.*

*Dann möchte ich mich bei meiner lieben Familie bedanken:*

*Bei meiner Mami & meinem Papi dafür, dass sie wirklich immer für uns drei Mädels da sind. Und Danke für die ausgiebige Komma-Diskussion (Dank der neuen Rechtschreibung). Einen Dank auch an meine beiden Schwesterchen, Miri & Jana, für viel Verständnis, der Arbeitsplatzbeschaffung in Berlin und natürlich für die willkommene Ablenkung.*

*Zuletzt möchte ich mich bei meinem Mann Stephan bedanken, der mich, soweit wie irgendwie möglich, in allen Lebenslagen unterstützt hat (Von A wie Aufmunterung bis Z wie Zunder geben). Und nicht zu vergessen der Kampf mit den Fremdwörtern beim Korrekturlesen. Danke, dass Du, obwohl du nur „bla-ble-cre-luc-aph-gfp-rbes“ (???) verstanden hast, und du dich wahrscheinlich immer noch fragst, was Deine Frau die letzten Jahre eigentlich gemacht hat, trotzdem tapfer durchgehalten und weiter gelesen hast!*